

平成 28 年度博士論文

低酸素曝露がラットの糖質代謝に与える影響と
クエン酸投与の有効性に関する研究

昭和女子大学

生活機構研究科

生活機構学専攻

原 百合恵

目次

序論	1
第1章 クエン酸の投与が糖質代謝および炎症に及ぼす影響	
緒言	3
第1節 クエン酸投与によるマウス骨格筋の遺伝子発現変動の解析	
1. 目的	4
2. 方法	5
2.1 実験動物とプロトコール	
2.2 骨格筋の遺伝子発現量の網羅的解析 -DNA マイクロアレイ解析-	
2.3 血液生化学分析	
2.3.1 血漿クエン酸濃度の測定	
2.3.2 血糖値および血中乳酸値の測定	
2.4 統計	
3. 結果	7
3.1 骨格筋の遺伝子発現量の網羅的解析 -DNA マイクロアレイによる解析-	
3.1.1 クエン酸投与がマウス骨格筋の糖質代謝関連遺伝子発現に及ぼす影響	
3.1.2 クエン酸投与がマウス骨格筋の炎症関連遺伝子発現に及ぼす影響	
3.2 血液生化学分析	
4. 考察	16
第2節 クエン酸投与によるマウス肝臓の遺伝子発現変動の解析	
1. 目的	18
2. 方法	19
2.1 実験動物とプロトコール	
2.2 肝臓の遺伝子発現量の網羅的解析 -フォーカストアレイ解析-	
2.2.1 肝臓の total RNA の抽出	
2.2.2 フォーカストアレイ解析	

2.3	血液生化学分析	
2.3.1	血漿クエン酸濃度の測定	
2.3.2	血糖値および血中乳酸値の測定	
2.4	肝臓中グリコーゲンの抽出と測定	
2.5	統計	
3.	結果	21
3.1	フォーカストアレイ解析	
3.2	血漿クエン酸濃度と血液生化学分析	
3.3	肝臓グリコーゲン量	
4.	考察	26
	小括	28
第2章 低酸素曝露がラットの糖質代謝に及ぼす影響とクエン酸投与の有効性		
-肝臓および骨格筋を用いた検討-		
1.	緒言	29
2.	方法	30
2.1	実験動物とプロトコール	
2.2	血液生化学分析	
2.2.1	血漿クエン酸濃度の測定	
2.2.2	血糖値と血中乳酸値の測定	
2.2.3	血漿遊離脂肪酸の測定	
2.3	肝臓とヒラメ筋中グリコーゲン量の測定	
2.4	肝臓およびヒラメ筋の遺伝子発現量解析	
2.4.1	total RNA の抽出	
2.4.2	逆転写反応 (complementary DNA (cDNA) の合成)	
2.4.3	リアルタイム PCR による遺伝子発現量解析	
2.5	ウエスタンブロットによる肝臓およびヒラメ筋の HIF-1 α の測定	
2.5.1	総タンパク質の抽出および測定	
2.5.2	電気泳動	

2.5.3	転写およびブロッキング	
2.5.4	抗原抗体反応	
2.6	統計	
3.	結果	36
3.1	呼吸数	
3.2	血漿クエン酸濃度	
3.3	血糖値と血中乳酸値	
3.4	血漿遊離脂肪酸濃度	
3.5	肝臓とヒラメ筋中グリコーゲン量	
3.6	肝臓の遺伝子発現量解析	
3.6.1	糖取込みと解糖系に関わる遺伝子発現量	
3.6.2	グリコーゲン代謝に関わる遺伝子発現量	
3.6.3	糖新生に関わる遺伝子発現量	
3.7	ヒラメ筋の遺伝子発現量解析	
3.7.1	糖取込みと解糖系に関わる遺伝子発現量	
3.7.2	グリコーゲン代謝に関わる遺伝子発現量	
3.7.3	糖新生に関わる遺伝子発現量	
3.8	低酸素誘導因子 (HIF) -1 α のタンパク質発現比	
4.	考察	53
5.	小括	57

第3章 低酸素曝露およびクエン酸投与が TCA 回路内代謝物と糖原性アミノ酸に及ぼす影響

1.	緒言	58
2.	方法	59
2.1	実験動物とプロトコール	
2.2	LC-MS/MS による TCA 回路内代謝物と糖原性アミノ酸の血漿中濃度の分析	
2.2.1	サンプル調製	
2.2.2	LC-MS/MS 装置および測定条件	

2.2.3	データ解析	
2.3	肝臓およびヒラメ筋中の ATP 抽出および測定	
2.4	統計	
3.	結果	62
3.1	LC-MS/MS による TCA 回路内代謝物と糖原性アミノ酸の血漿中濃度の分析	
3.1.1	TCA 回路内の代謝物と乳酸	
3.1.2	ピルビン酸とオキサロ酢酸を介する糖原性アミノ酸	
3.1.3	α -ケトグルタル酸を介する糖原性アミノ酸	
3.1.4	サクシニル-CoA とフマル酸を介する糖原性アミノ酸	
3.2	肝臓およびヒラメ筋中の相対 ATP 量	
4.	考察	69
5.	小括	72
	総括	73
	参考文献	75
	謝辞	82

序論

呼吸器疾患の1つである慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) は、世界における死亡原因の第3位であることが世界保健機関 (World Health Organization, WHO) により報告されている (WHO, 2014)。また、日本における COPD の死亡順位は 10 位であり今後さらに上がるとされている (厚生労働省人口動態統計, 2014)。このように、COPD は死因の上位に位置しているにも関わらず食事療法は確立されていないため、早期の検討が必要であると考えられる。現在、COPD の食事療法としては、1. 呼吸障害に伴うエネルギー消費の増大による体重減少を防ぐことを目的とした十分なエネルギー補給、2. 炎症を防ぐことを目的とした n-3 系多価不飽和脂肪酸摂取、などが挙げられているが有効なエビデンスがないのが現状である。

COPD は、タバコ煙などの有毒な粒子やガスの長期的な吸入によって生じた肺の炎症反応に基づく進行性の気流閉塞を呈する疾患で、全身性の炎症を特徴としている。気流閉塞により労作性呼吸困難と疲労感が生じ、身体活動性が低下することが COPD 患者の問題の1つとなっている (Antoniou et al. 2016; Paddison et al. 2013; Wu et al. 2014)。気流閉塞により身体が低酸素状態になると、呼吸の調節のみならず、組織の酸素分圧の低下が引き金となり、脳、心臓、骨格筋、腎臓、肝臓など様々な臓器でのエネルギー代謝の変化や、赤血球新生、全身性炎症の誘導などが生じることがわかっている (Woolcott et al. 2015; Eltzschig and Carmeliet 2011)。これらの低酸素に対する生体応答は、低酸素応答と呼ばれている。

本研究では、COPD をはじめとする呼吸器疾患患者の疲労感には、低酸素状態によるエネルギー代謝の変化や炎症誘導が関与している可能性があると考え、低酸素応答の中でも特に糖質代謝の変化と炎症反応に着目した。さらに、一般的に身体に良いと考えられ、特に疲労軽減効果が期待されているクエン酸が呼吸器疾患に有効な食品成分となり得るかを検討するために、第1章では、クエン酸の投与が糖質代謝の変化や炎症に対して及ぼす影響を、マウスの骨格筋と肝臓を用いた遺伝子発現の網羅的解析にて明らかにした。第2章では、第1章の結果をふまえ、低酸素曝露したラットに対するクエン酸投与の有効性について、糖質代謝に焦点をあてて遺伝子発現レベルで検証した。第3章では、ラットに対する低酸素曝露とクエン酸投与の影響を、代謝物レベルで検討した。

クエン酸投与により COPD 患者の疲労感が軽減されれば、食事療法を確立するため

の基礎的知見を得ることができ、疾患そのものへのアプローチではないものの、患者の日常生活動作（activity of daily living, ADL）や生活の質（quality of life, QOL）の維持および向上に寄与できるものと考えられる。

第1章 クエン酸の投与が糖質代謝および炎症に及ぼす影響

緒言

クエン酸はレモンなどの柑橘類に多く含まれる有機酸の一種で、疲労軽減効果が期待され、スポーツ栄養などの場で用いられている。ヒト試験では、運動前のクエン酸摂取が身体疲労を減弱することや、運動パフォーマンスを改善することなどが報告されているが (Sugino et al. 2007; McNaughton et al. 1992)、そのメカニズムは未だ明らかにされていない。

クエン酸摂取による疲労軽減メカニズムの仮説としては、血中の乳酸蓄積の抑制、ATP 産生の増加、運動により減少したグリコーゲンの補完など、糖質代謝への影響が挙げられている。血中の乳酸蓄積の抑制は、摂取したクエン酸が tricarboxylic acid cycle (TCA 回路) 内で生じたクエン酸と同様に、解糖系の律速酵素であるホスホフルクトキナーゼ (Pfk) を阻害することによってピルビン酸の過剰蓄積を抑制することに起因すると考えられている (Miyake et al. 2001; Penelope et al. 1972)。ATP 産生の増加は、摂取したクエン酸がミトコンドリア内に直接供給され、ミトコンドリア内の TCA 回路や電子伝達系の反応が亢進することによると考えられている (Sugino et al. 2007)。運動により減少したグリコーゲンの補完は、クエン酸摂取により Pfk が阻害されグルコース-6-リン酸が上昇し、グリコーゲン合成が亢進することによると考えられている (Saitoh et al. 1983)。また、最近、クエン酸には炎症抑制効果があると報告されている (Bryland et al. 2012; Abdel-Salam et al. 2014)。運動時に生じる炎症は疲労感の原因の1つであると考えられるため (Peake et al. 2007)、クエン酸摂取による疲労軽減効果には、炎症の抑制が関与している可能性もある。しかし、これらの疲労軽減メカニズムに関する十分なエビデンスは見当たらない。そこで、クエン酸投与による疲労軽減メカニズムを探ることを目的とした。

本章では、代謝の中心臓器である肝臓と骨格筋を用いて、特に低酸素による疲労感と関連が深いと推察される糖質代謝と炎症に着目し、遺伝子発現レベルでクエン酸の機能を検証した。第1節では、マウスの骨格筋を用いて DNA マイクロアレイにより遺伝子発現量を網羅的に検討した。第2節では、マウスの肝臓を用いて対象遺伝子を絞り込んだフォーカストアレイにより遺伝子発現量を網羅的に解析した。

第1節 クエン酸投与によるマウス骨格筋の遺伝子発現変動の解析

1. 目的

本節では、クエン酸摂取による疲労軽減メカニズムを明らかにすることを目的とし、マウス骨格筋を用いて、糖質代謝を中心とするエネルギー代謝および炎症関連遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法により網羅的に解析した。

2. 方法

2.1 実験動物とプロトコール

8週齢の雄性 C57BL/6J マウスを日本チャールス・リバー（株）より購入した。マウスは、飼育温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、12 時間明暗サイクル（明期 8 時～20 時）の環境下にて、プラスチックケージで個別飼育した。市販の固形飼料（CRF-1：日本チャールス・リバー（株））にて 1 週間予備飼育した後、各群の平均体重が等しくなるように、蒸留水投与群（Control）とクエン酸投与群（Citric acid）の 2 群に分けた（ $n = 3$ ）。摂食による影響を除くためマウスを一晩絶食、2 時間絶水させた後、蒸留水またはクエン酸溶液（ $20 \text{ mg citric acid}/30 \text{ g body weight}$ ）をゾンデにて胃内投与した。投与 30 分後に断頭屠殺し、血液、および骨格筋としてヒラメ筋と腓腹筋を合わせて採取した。クエン酸投与後の解剖までの時間は、安川らの報告より血漿クエン酸濃度が最大となる 30 分に設定した（Yasukawa et al. 1991）。血液を用いて血糖値、乳酸値を測定した。また、血液を遠心分離（ $10,000 \times g$, 5 min）し、血漿を得た。血漿は分析まで -30°C にて冷凍保存し、血漿クエン酸濃度の測定に用いた。骨格筋は直ちに RNAlater（キアゲン（株））に浸漬し、DNA マイクロアレイ解析に供した。本研究は、昭和女子大学実験動物倫理委員会の承認を得た後（承認番号：11-04）、動物実験倫理規定に従い実施した。

2.2 骨格筋の遺伝子発現量の網羅的解析 -DNA マイクロアレイ解析-

解剖時には、骨格筋を一片 5 mm 程度にカットし RNAlater に浸漬した。DNA マイクロアレイ解析（Agilent Technologies）は、DNA チップ研究所に委託した。Pathway 解析には GenMapp（Gladstone Institutes, University of California at San Francisco）を使用した。

2.3 血液生化学分析

2.3.1 血漿クエン酸濃度の測定

血漿クエン酸濃度の測定は、安川らの方法（Yasukawa et al. 1985; Yasukawa et al. 1991）を改良して行った。

すなわち、血漿 $250 \mu\text{L}$ に 6%過塩素酸 $500 \mu\text{L}$ を添加し、5 分間放置した後、遠心分離（ $10,000 \times g$, 5 分間）を行い、上清を得た。この上清 $500 \mu\text{L}$ を 2N KOH 約 $150 \mu\text{L}$ で中和した。その後、1.2M KCl/1M Tris HCl buffer pH8.6 を $350 \mu\text{L}$ 加え、遠心分離

(10,000×g, 5 分間) を行った。上清 500 μL を採取し、混合試薬 (1M Tris HCl buffer pH8.6 0.025 mL/sample, 0.4 mM ZnSO₄ 0.25 mL/sample, β-NADH 0.2 mL/sample, Malate dehydrogenase 0.025 mL/sample) を 500 μL 加え、室温で 5 分間放置した後、250 μL ずつに分けた。一方には溶媒として 0.15 M Tris HCl buffer pH8.6 を 20 μL、もう一方にはクエン酸リアーゼ (0.5 mg/0.15 M Tris HCl buffer) を 20 μL 添加し、室温で 20 分間放置した。放置後、340nm における吸光度を分光光度計にて測定し、2 検体間の吸光度の差から NADH の消費量を求め、血漿クエン酸濃度を算出した。

2.3.2 血糖値および血中乳酸値の測定

解剖時に血糖値と血中乳酸値の測定を行った。血糖値は、メディセーフチップ (テルモ (株)) を用いて測定した。血中乳酸値は、ラクテート・プロ (アークレイ (株)) を用いて測定した。いずれも 2 回測定し、平均値を求めた。

2.4 統計

データは全て平均値±標準誤差で示した。2 群間の平均値の差の検定には Student の t 検定を用いた。P < 0.05 の時、有意差ありとした。

3. 結果

3.1 骨格筋の遺伝子発現量の網羅的解析 -DNA マイクロアレイによる解析-

3.1.1 クエン酸投与がマウス骨格筋の糖質代謝関連遺伝子発現に及ぼす影響

クエン酸の投与により、糖新生の律速酵素である phosphoenolpyruvate carboxykinase1 (*Pck1*) の遺伝子発現量は 11.1 倍に上昇した (Fig. 1-1)。解糖系の律速酵素である hexokinase 1,2 (*Hk1*, *Hk2*)、phosphofructokinase (*Pfkm*)、pyruvatekinase2 (*Pkm2*) の遺伝子発現量には影響がみられなかった (Fig. 1-1)。また、クエン酸投与は、TCA 回路内および電子伝達系の遺伝子発現量にも影響を与えなかった (Fig. 1-2, Fig. 1-3)。グリコーゲン分解酵素である glycogen phosphorylase (*Pygl*) はクエン酸投与により 1.78 倍に上昇した (Fig. 1-4)。

3.1.2 クエン酸投与がマウス骨格筋の炎症関連遺伝子発現に及ぼす影響

炎症性サイトカインの受容体である tumor necrosis factor (TNF) -alpha receptor 2 (*Tnfr2*) は-1.8 倍に低下した (Fig. 1-5)。Interleukin (IL) -1 receptor, type 1 (*Il1r1*)、IL-1 receptor, type2 (*Il1r2*)、IL-6 receptor, alpha (*Il6ra*) もそれぞれ-1.8 倍、-3.1 倍、-1.9 倍に低下した (Fig.1-6, Fig. 1-7)。

3.2 血液生化学分析

血漿クエン酸濃度、血糖値、血中乳酸値の結果を Fig. 1-8 に示した。血漿クエン酸濃度は、3 匹分の血漿をプールして測定した。クエン酸投与群の血漿クエン酸濃度は 12.1 mg/dL であり、蒸留水投与群の 3.6 mg/dL と比較して高値を示した (Fig. 1-8 (a))。血糖値は、蒸留水投与群 106 ± 17 mg/dL、クエン酸投与群 245 ± 9 mg/dL で、クエン酸投与群で有意に高値を示した (Fig.1-8 (b))。血中乳酸値は、蒸留水投与群 2.8 ± 0.4 mM、クエン酸投与群 2.4 ± 0.3 mM で、両群間に有意な差は認められなかった (Fig. 1-8 (c))。

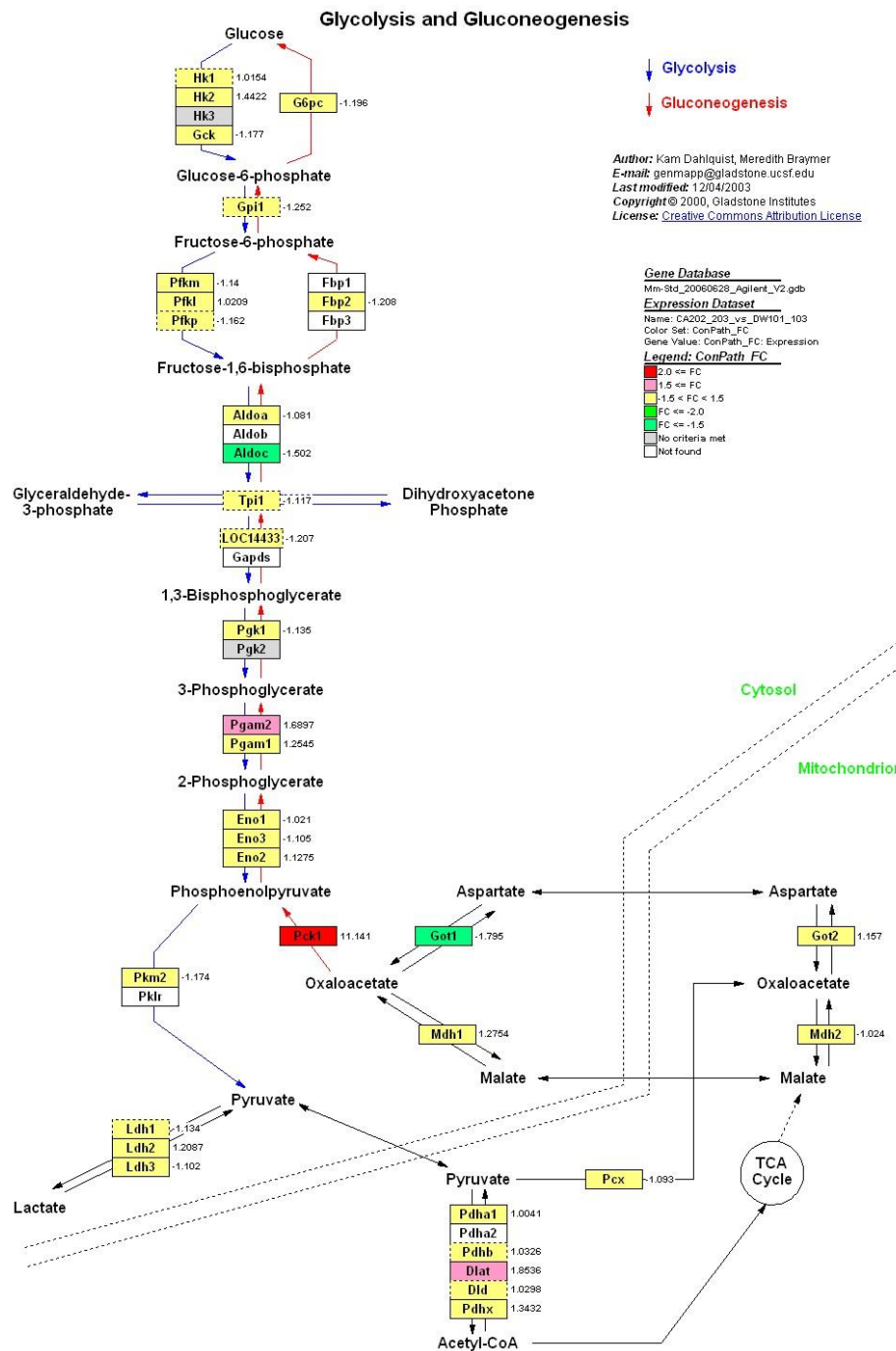


Fig. 1-1 Pathway map of glycolysis and gluconeogenesis acquired by DNA microarray analysis

This figure shows the changes of mRNA expression in glycolysis and gluconeogenesis of C57BL/6J mice skeletal muscle after citric acid intake. Green shows $-2.0 \leq$ expression ratio ≤ -1.5 fold change. Yellow shows $-1.5 <$ expression ratio < 1.5 fold change. Pink shows $1.5 \leq$ expression ratio < 2.0 fold change. Red shows $2.0 \leq$ fold change.

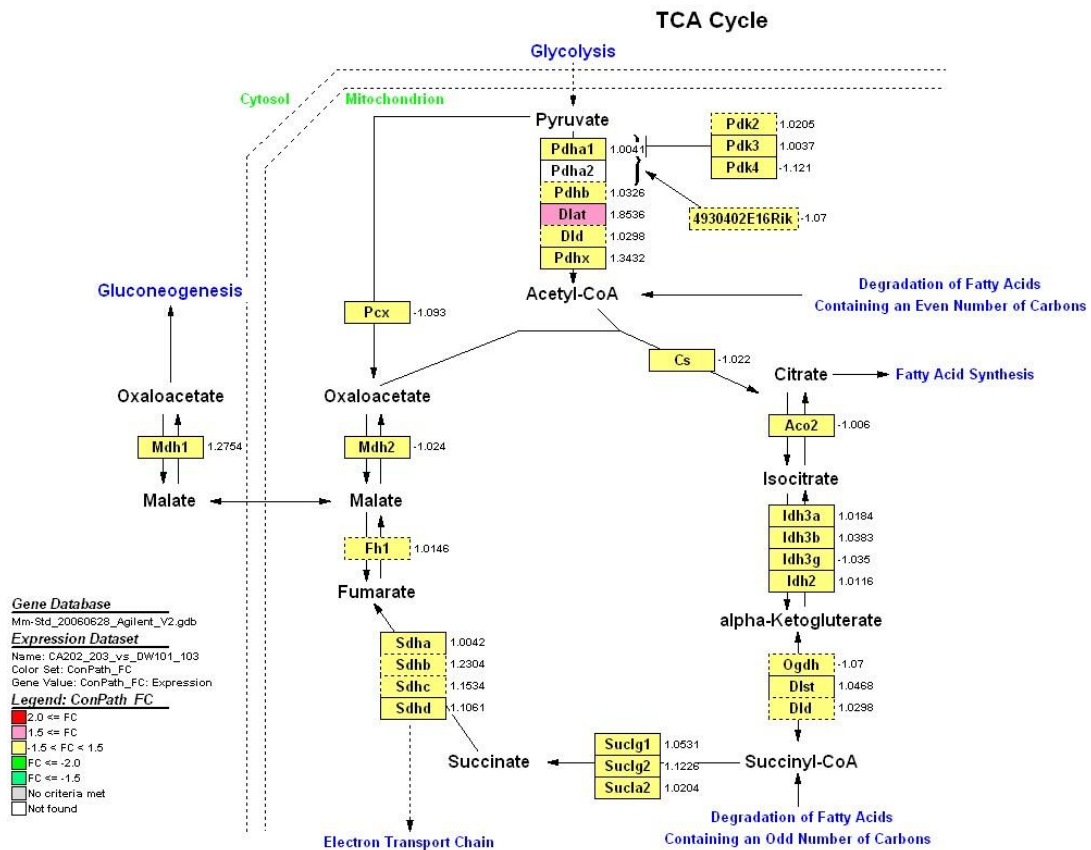


Fig. 1-2 Pathway map of TCA cycle acquired by DNA microarray analysis

This figure shows the changes of mRNA expression in tricarboxylic acid (TCA) cycle of C57BL/6J mice skeletal muscle after citric acid intake. Yellow shows $-1.5 < \text{expression ratio} < 1.5$ fold change. Pink shows $1.5 \leq \text{expression ratio} < 2.0$ fold change.

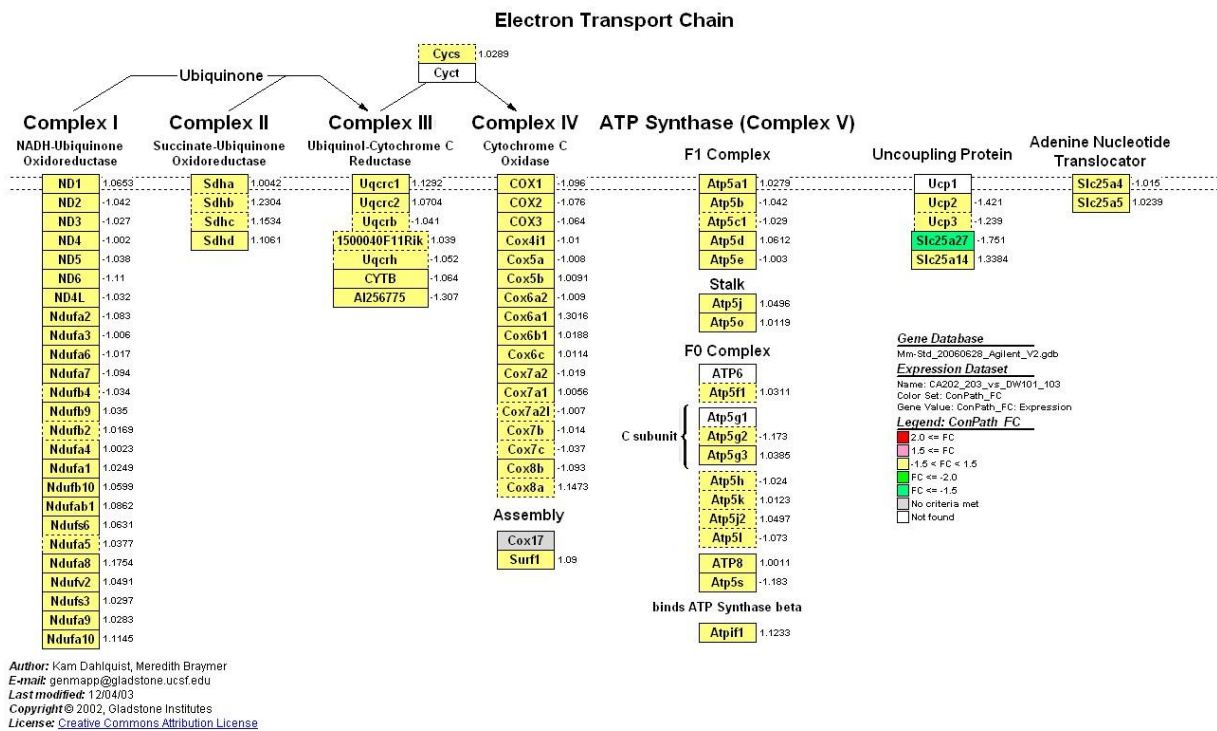


Fig. 1-3 Pathway map of electron transport chain acquired by DNA microarray analysis

This figure shows the changes of mRNA expression in electron transport chain of C57BL/6J mice skeletal muscle after citric acid intake. Green shows $-2.0 \leq \text{expression ratio} \leq -1.5$ fold change. Yellow shows $-1.5 < \text{expression ratio} < 1.5$ fold change.

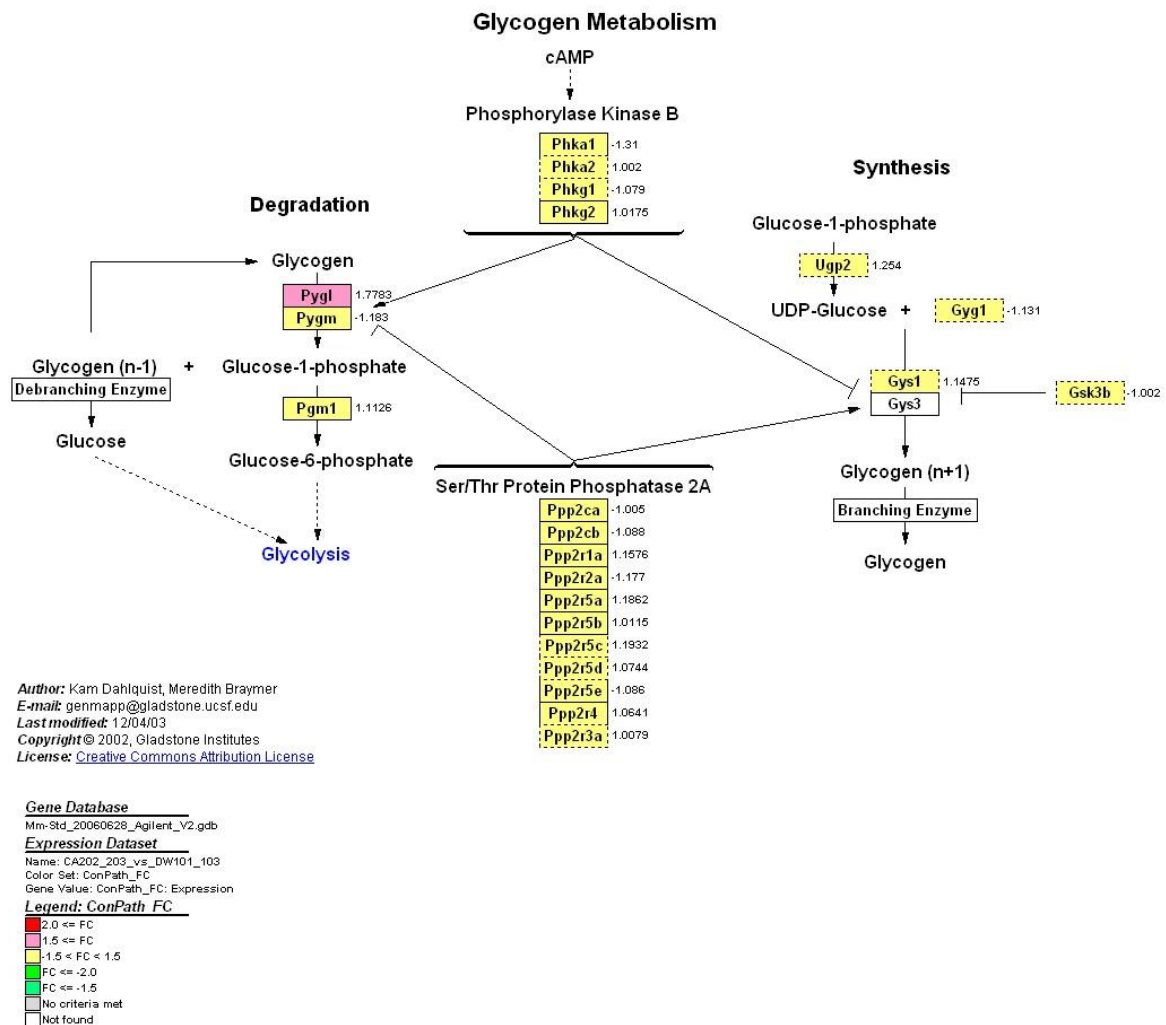


Fig. 1-4 Pathway map of glycogen metabolism acquired by DNA microarray analysis

This figure shows the changes of mRNA expression in glycogen metabolism of C57BL/6J mice skeletal muscle after citric acid intake. Yellow shows $-1.5 < \text{expression ratio} < 1.5$ fold change. Pink shows $1.5 \leq \text{expression ratio} < 2.0$ fold change.

TNF-alpha/NF-kB Signaling Pathway

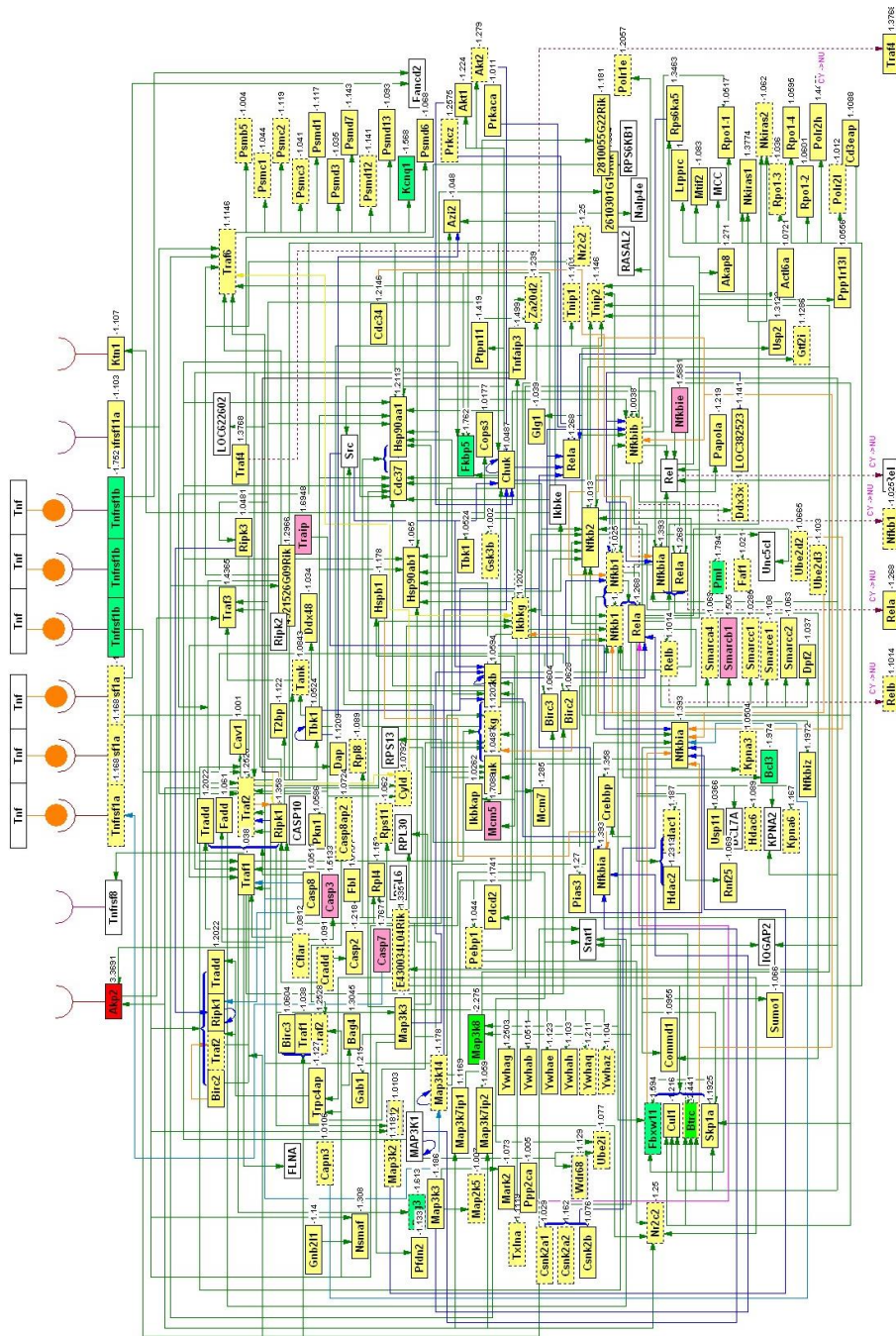


Fig. 1-5 Pathway map of TNF-alpha/NF-κB signaling acquired by DNA microarray analysis

This figure shows the changes of mRNA expression in TNF-alpha/NF-κB signaling of C57BL/6J mice skeletal muscle after citric acid intake. Green shows $-2.0 \leq$ expression ratio ≤ -1.5 fold change. Yellow shows $-1.5 <$ expression ratio < 1.5 fold change. Pink shows $1.5 \leq$ expression ratio < 2.0 fold change. Red shows $2.0 \leq$ fold change.

IL-1 Signaling Pathway

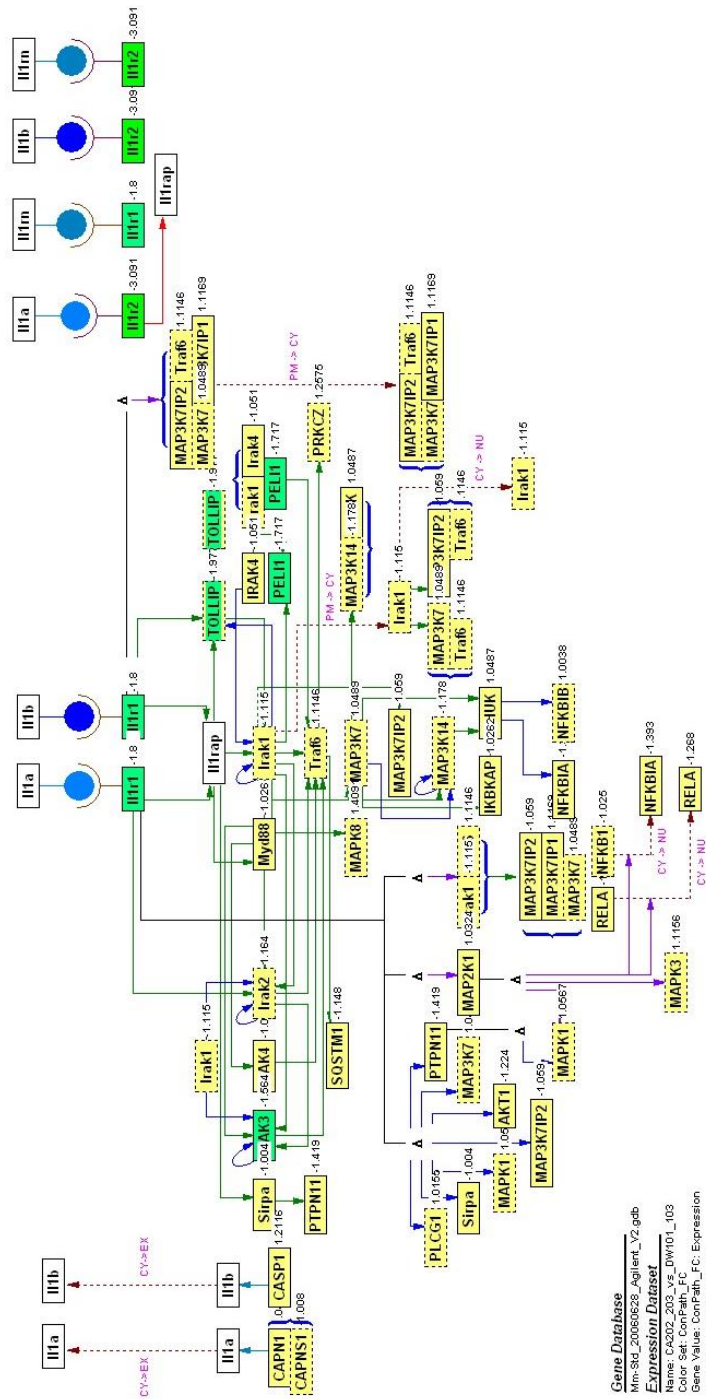


Fig. 1-6 Pathway map of IL-1 signaling acquired by DNA microarray analysis

This figure shows the changes of mRNA expression in IL-1 signaling of C57BL/6J mice skeletal muscle after citric acid intake. Green shows $-2.0 \leq \text{expression ratio} \leq -1.5$ fold change. Yellow shows $-1.5 < \text{expression ratio} < 1.5$ fold change.

Author: IOB, PandeyLab
 E-mail: info@netpath.org
 Last modified: 02-JUN-06
 http://www.netpath.org
 Copyright © Freely available under Creative Commons license
 License: Creative Commons Attribution License

IL-6 signaling pathway

Gene Database
 Mm-Std_20060628_Agilent_V2.gdb
Expression Dataset
 Name: CA202_202_vs_DW101_103
 Color Set: ConPath_FC
 Gene Value: ConPath_FC: Expression
Legend: ConPath_FC
 2.0 ≤ FC
 1.5 ≤ FC
 -1.5 < FC < 1.5
 FC ≤ -2.0
 FC ≤ -1.5
 No criteria met
 Not found

Accession Number: NetPath_18

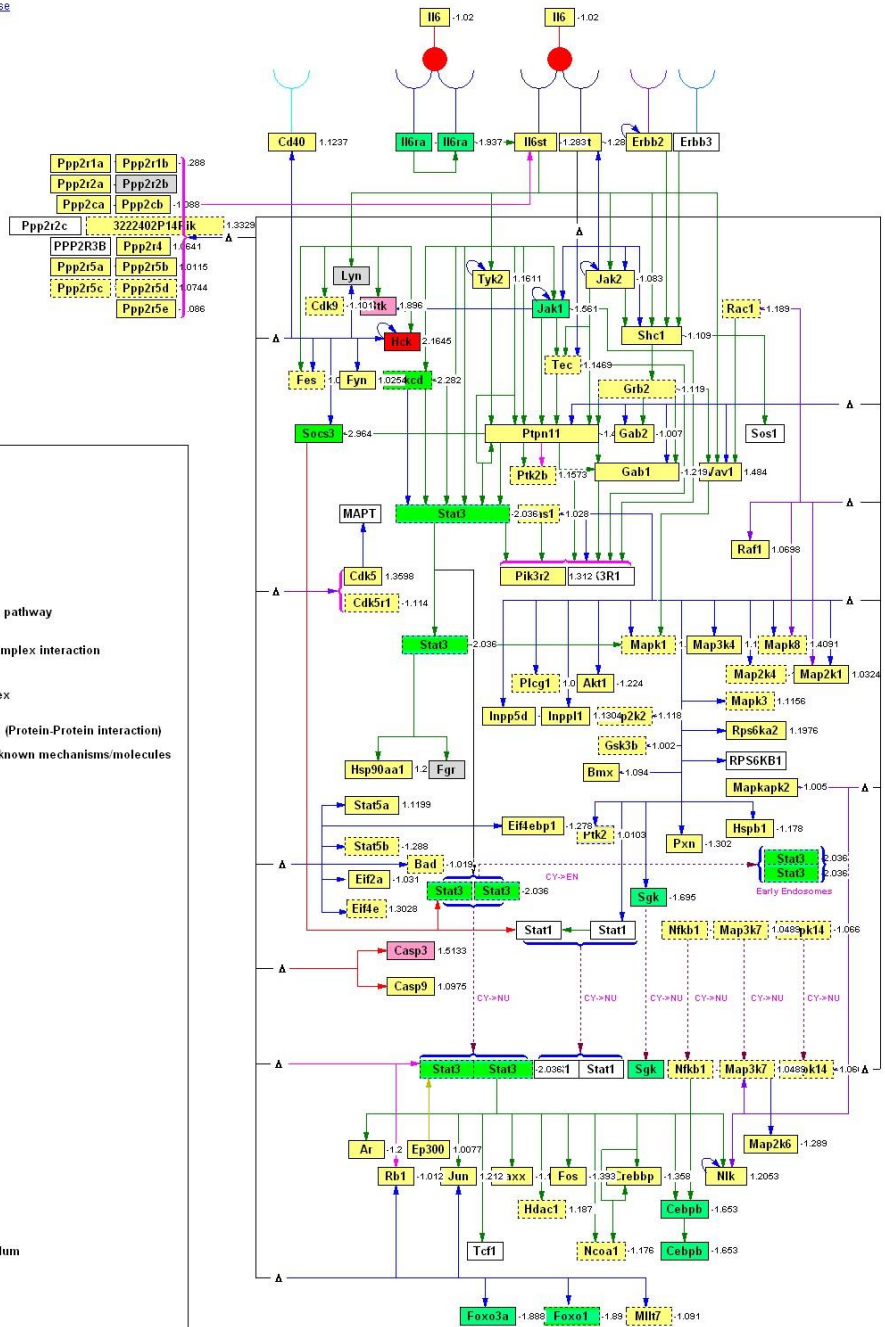
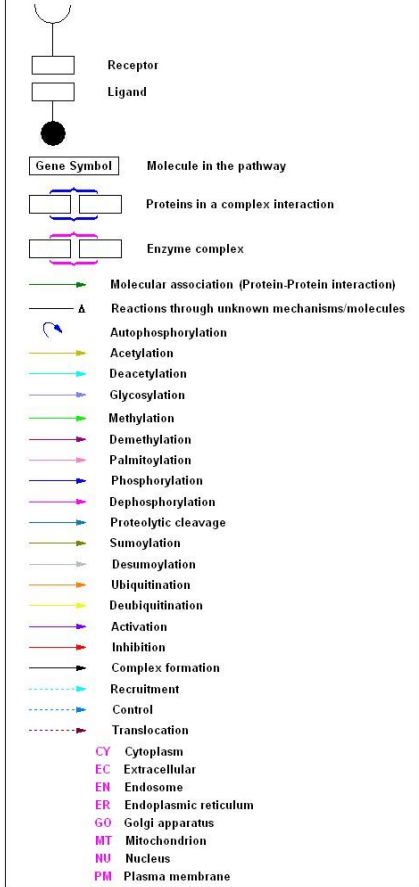


Fig. 1-7 Pathway map of IL-6 signaling acquired by DNA microarray analysis

This figure shows the changes of mRNA expression in IL-6 signaling of C57BL/6J mice skeletal muscle after citric acid intake. Green shows $-2.0 \leq$ expression ratio ≤ -1.5 fold change. Yellow shows $-1.5 <$ expression ratio < 1.5 fold change. Pink shows $1.5 \leq$ expression ratio < 2.0 fold change. Red shows $2.0 \leq$ fold change.

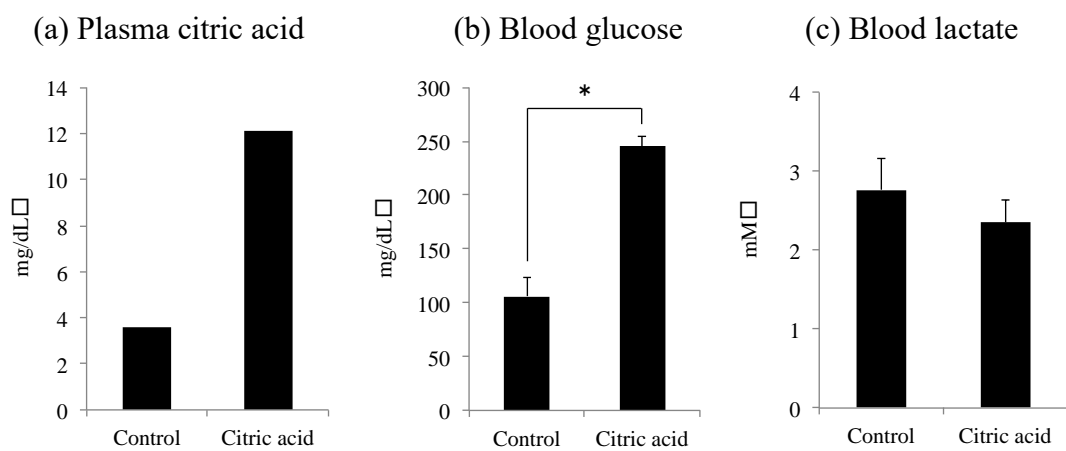


Fig. 1-8 The levels of (a) plasma citric acid, (b) blood glucose, (c) blood lactate

This figure shows plasma citric acid, blood glucose, and blood lactate levels of C57BL/6J mice after citric acid intake. Data of (a) plasma citric acid was measured using pooled samples of three mice. Data of (b) blood glucose and (c) blood lactate are means \pm SE (n = 3). Statistical significance was determined by Student's t-test. Asterisk represents a significant difference ($P < 0.05$).

4. 考察

クエン酸摂取の疲労軽減メカニズムとしては、血中の乳酸蓄積の抑制、ATP 産生の増加、運動後のグリコーゲン補完など糖質代謝への影響などが挙げられてきたが、詳細なメカニズムは明らかにされてこなかった。そこで本節では、クエン酸の疲労軽減メカニズムを明らかにすることを目的とし、クエン酸投与によるマウス骨格筋の遺伝子発現量の変化を、特に糖質代謝と炎症に着目して網羅的に解析した。その結果、クエン酸投与による疲労軽減効果は、乳酸蓄積抑制、TCA 回路や電子伝達系の活性化によるものではなく、糖新生の亢進と炎症の抑制に起因している可能性が示された。

クエン酸投与による乳酸蓄積抑制に関しては、ヒトにクエン酸溶液 (0.4 g/kg 体重) を摂取させると、運動後に上昇した血中乳酸値の低下が促進されたとの報告がある (Miyake et al. 2001)。そのメカニズムの1つとして、摂取したクエン酸が解糖系の律速酵素ホスホフルクトキナーゼ (Pfk) の阻害剤となり、解糖系を抑制することが挙げられている (Miyake et al. 2001)。一方で、本節ではクエン酸投与により *Pfk* の遺伝子発現量の低下および血中乳酸値の減少はみられず、クエン酸投与による *Pfk* 阻害を介した乳酸蓄積抑制効果はみられなかった。本研究で乳酸蓄積抑制効果がみられなかったのは、マウスが非運動絶食条件下であったことも考えられる。

クエン酸の疲労軽減メカニズムの1つとして、摂取したクエン酸がミトコンドリア内に供給されることにより TCA 回路や電子伝達系が活性化され、ATP 産生が増加する可能性も報告されている (Sugino et al. 2007)。しかし、本研究では、クエン酸投与により TCA 回路および電子伝達系の遺伝子発現量は変化しなかった。したがって、クエン酸投与は TCA 回路および電子伝達系を活性化せず、投与したクエン酸がミトコンドリア内に直接供給される可能性は低いことが示唆された。以上より、クエン酸投与による疲労軽減効果は、乳酸蓄積抑制や TCA 回路・電子伝達系の活性化によるものではない可能性が示唆された。

一方で、本節では糖新生の律速酵素である phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (*Pck1*) の遺伝子発現量が 11.1 倍に増加した。さらに、この時のクエン酸投与群の血糖値は 245 ± 9 mg/dL で、蒸留水投与群の 106 ± 17 mg/dL と比較して有意に高かったことから、クエン酸投与により糖新生が亢進する可能性が示された。クエン酸投与による糖新生亢進に関する報告はこれまで見当たらず、本研究が初めての報告である。しかし、*Pck1* によって糖新生が制御されている臓器は主に肝臓であるため、肝臓での検討

も必要である。また、クエン酸投与により糖新生が亢進すると、糖新生の基質が消費されると推察される。糖新生の基質の1つは乳酸であるが、本研究ではクエン酸投与群の乳酸値は変化しなかったことから、乳酸が基質となったとは考えにくい。しかし、クエン酸摂取により血中乳酸濃度が低下するという報告があるため (Miyake et al. 2001; Penelope and Lee 1972)、クエン酸投与により糖新生が亢進し、その基質として乳酸が利用されることで速やかな乳酸除去が行われる可能性もある。

また、グリコーゲン代謝関連遺伝子発現量では、グリコーゲン分解酵素の glycogen phosphorylase (*Pygl*) が 1.78 倍に上昇し、クエン酸投与はグリコーゲンの分解を亢進する可能性が示された。しかし、*Pygl* は肝臓に存在する酵素であるため、今後、肝臓を用いた検討が必要である。

クエン酸投与により炎症が抑制されることが報告されており (Abdel-Salam et al. 2014; Abdel-Salam et al. 2015)、この炎症の抑制がクエン酸の疲労軽減効果をもたらしている可能性もある。本研究でもクエン酸投与により TNF-alpha reseptor 2 (*Tnfr2*)、Interleukin-1 receptor, type 1 (*Il1r1*)、Interleukin-1 receptor, type2 (*Il1r2*)、IL-6 receptor, alpha (*Il6ra*) の遺伝子発現が低下しており、クエン酸投与が炎症を抑制する可能性が示された。運動時には筋肉由来の IL-6 が上昇することが明らかになっている (Pedersen and Febbraio 2008)。また、運動後のヒトにおいて IL-6 および TNF- α が上昇すると報告されており (Starkie et al. 2001; Nieman et al. 1985)、その上昇を抑制する薬剤や食品の探索が試みられていることから (Peake et al. 2007)、運動時の炎症を抑制することは疲労軽減のために重要であると推察される。したがって、クエン酸摂取には炎症抑制による疲労軽減効果がある可能性も示唆された。

以上より、本節ではクエン酸投与による疲労軽減効果は、乳酸蓄積抑制、TCA 回路や電子伝達系の活性化などを介していないことが示された。一方で、クエン酸投与は、糖新生亢進と炎症抑制により疲労軽減に寄与している可能性が遺伝子発現レベルで示された。

第 2 節 クエン酸投与によるマウス肝臓の遺伝子発現変動の解析

1. 目的

第 1 節ではクエン酸の疲労軽減メカニズムを明らかにするために、クエン酸投与による遺伝子発現の変化を、マウス骨格筋を用いた DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、クエン酸投与による疲労軽減効果は、これまで仮説として挙げられてきた乳酸の蓄積抑制や、TCA 回路・電子伝達系の活性化による ATP 産生の増加を介していない可能性が示された。一方で、クエン酸投与により血糖値と *Pck1* の遺伝子発現が上昇しており、糖新生が亢進する可能性が示された。しかし、糖新生が進行する主な臓器は肝臓であることから、肝臓を用いた検討が必要である。また、第 1 節では骨格筋を用いたが、肝臓のグリコーゲン分解に関わる遺伝子である *Pygl* の発現上昇しており、肝臓においてもグリコーゲン分解が上昇するのかを明らかにする必要がある。

そこで本節では、クエン酸投与による血糖値の上昇が、肝臓での糖新生亢進やグリコーゲンの分解に起因するのかが明らかにすることを目的とし、クエン酸投与が肝臓の遺伝子発現に与える影響をフォーカストアレイにて網羅的に解析した。

2. 方法

2.1 実験動物とプロトコール

8週齢の雄性 C57BL/6J マウスを日本チャールス・リバー（株）より購入した。マウスは、飼育温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、12 時間明暗サイクル（明期 8 時～20 時）の環境下にて、プラスチックケージで個別飼育した。市販の固形飼料（CRF-1：日本チャールス・リバー（株））にて 1 週間予備飼育した後、各群の平均体重が等しくなるように、蒸留水投与群（Control）とクエン酸投与群（Citric acid）の 2 群に分けた（ $n = 6$ ）。マウスを一晩絶食、2 時間絶水させた後、蒸留水またはクエン酸溶液（ $20 \text{ mg}/30 \text{ g body weight}$ ）をゾンデにて胃内投与した。投与 40 分後に断頭屠殺し、血液および肝臓を採取した。血液を用いて血糖値、乳酸値を測定した。また、採血した血液を遠心分離（ $10,000 \times g$, 5 min ）し、血漿を得た。血漿は分析まで -30°C にて冷凍保存し、血漿クエン酸濃度の測定に用いた。肝臓は total RNA の抽出とグリコーゲン量の測定に用いた。肝臓の一部は、1 片 $5 \times 5 \text{ mm}$ 程度の大きさに切り取り、直ちに RNAlater（キアゲン（株））に浸漬し、total RNA 抽出まで -80°C で冷凍保存した。残りの肝臓は分析まで -30°C で保存し、グリコーゲン量の測定に用いた。本研究は、昭和女子大学実験動物倫理委員会の承認を得た後（承認番号：13-05）、動物実験倫理規定に従い実施した。

2.2 肝臓の遺伝子発現量の網羅的解析 -フォーカストアレイ解析-

2.2.1 肝臓の total RNA の抽出

解剖時に RNAlater に浸漬し -80°C で冷凍保存しておいた肝臓約 20 mg を用いて、RNeasy Mini Kit（キアゲン（株））により total RNA を抽出した。total RNA の純度は、 $260 \text{ nm}/280 \text{ nm}$ の吸光度の比から算出し、 $1.8 \sim 2.0$ の範囲に収まっていることを確認した。

2.2.2 フォーカストアレイ解析

肝臓の遺伝子発現量の網羅的解析（フォーカストアレイ解析）は、三菱レイヨン（株）に委託した。解析用チップは、エネルギー代謝関連遺伝子にフォーカスしたものを用いた。遺伝子発現の変化は、クエン酸投与群（citric acid, CA）/蒸留水投与群（distilled water, DW）の比で示した。第 1 節で用いた DNA マイクロアレイが約 4 万個の遺伝子発現量の変化を網羅的に解析する手法であるのに対し、フォーカストアレイは、約 200

個の遺伝子発現量を網羅的に解析する手法であり、リアルタイム PCR と同程度の再現性が認められている (Hohjoh and Fukushima 2007)。

2.3 血液生化学分析

2.3.1 血漿クエン酸濃度の測定

血漿クエン酸濃度の測定は、第 1 節 2.3.1 の血漿クエン酸濃度の測定と同様に行った。

2.3.2 血糖値および血中乳酸値の測定

血糖値および血中乳酸値の測定は、第 1 節 2.3.2 と同様に行った。

2.4 肝臓中グリコーゲンの抽出と測定

肝臓 100 mg に、10%トリクロロ酢酸 0.8 mL を添加しホモジナイズした後、遠心分離 (1,900×g, 5 min) した。上清 0.4 mL に 2 倍量の 95%エタノールを加えてよく混合した後、遠心分離 (1,900×g, 5 min) し、グリコーゲンを沈殿させた。上清を静かに取り除いた後、蒸留水を 0.5 mL 加えよく混合した。この溶液に 5%フェノール 0.5 mL を加えてよく混合し、濃硫酸 2.5 mL を加え 20 分間放置した後、490 nm における吸光度を分光光度計にて測定した。

2.5 統計

データは全て平均値±標準誤差で示した。2 群間の平均値の差の検定には Student の t 検定を用いた。P < 0.05 の時、有意差ありとした。

3. 結果

3.1 フォーカストアレイ解析

糖質代謝関連遺伝子の遺伝子発現比を Table 1 に示した。クエン酸投与により、解糖系の律速酵素である glucokinase (*Gck*)、phosphofructokinase (*Pfk1*)、pyruvate kinase (*Pklr*) の遺伝子発現量は変化しなかった。糖新生の律速酵素である phosphoenolpyruvate carboxykinase1 (*Pck1*)、glucose-6-phosphatase (*G6pc*) の遺伝子発現量も、クエン酸投与により変化しなかった。

炎症関連遺伝子、エネルギー産生関連遺伝子、抗酸化関連遺伝子発現比を Table 2 に示した。炎症マーカーの1つである interleukin-6 (*IL-6*) の遺伝子発現が、クエン酸投与により 0.78 倍に減少した ($P = 0.05$)。NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, nuclear gene encoding mitochondrial protein (*Ndufa4*) を含む 28 個のミトコンドリア内のエネルギー産生関連遺伝子は、クエン酸投与により減少した。抗酸化関連遺伝子である glutathione S-transferase, alpha 2 (*Gsta2*)、glutathione S-transferase, alpha 4 (*Gsta4*)、glutathione peroxidase 1 (*Gpx1*) はクエン酸投与により増加し、glutathione peroxidase 2 (*Gpx2*)、glutathione peroxidase 3 (*Gpx3*) は減少した。

3.2 血漿クエン酸濃度と血液生化学分析

血漿クエン酸濃度は、蒸留水投与群 4.2 ± 0.1 mg/dL、クエン酸投与群 8.3 ± 0.9 mg/dL で、クエン酸投与群で有意に高値を示した (Fig. 1-9 (a))。血糖値は、蒸留水投与群 125 ± 4 mg/dL、クエン酸投与群 153 ± 4 mg/dL で、クエン酸投与群で有意に高値を示した (Fig. 1-9 (b))。血中乳酸値は、蒸留水投与群 2.4 ± 0.2 mM、クエン酸投与群 2.2 ± 0.1 mM で、両群間に有意な差はみられなかった (Fig. 1-9 (c))。

3.3 肝臓グリコーゲン量

肝臓グリコーゲン量は、湿重量 100 g あたり、蒸留水投与群 38.9 ± 4.0 mg、クエン酸投与群 50.6 ± 7.0 mg で、蒸留水投与群と比較してクエン酸投与群で 130% に上昇したものの、両群間に有意な差はみられなかった (Fig. 1-10)。

Table 1. mRNA expression ratios of citric acid group to distilled water group (CA/DW) for genes related to glucose metabolism.

Accession No	Gene Symbol	Gene name	CA/DW	P value
NM_010292	Gck	Glucokinase	1.08	0.58
NM_008826	Pfkl	Phosphofructokinase, liver, B-type	0.83	0.17
NM_013631	Pklr	Pyruvate kinase liver and red blood cell, nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	1.16	0.36
NM_011044	Pck1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic	0.99	0.92
NM_008061	G6pc	Glucose-6-phosphatase, catalytic	0.88	0.36

Table 2. mRNA expression ratios of citric acid group to distilled water group (CA/DW) for genes related to inflammation, energy production, and anti-oxidation.

Functional classification	Accession No	Gene Symbol	Gene name	CA/DW	P value	
Inflammation	NM_031168	Il6	Interleukin 6	0.78	0.05	
	NM_010886	Ndufa4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, nuclear gene encoding mitochondrial protein	0.73	0.01	
	NM_133666	Ndufv1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, nuclear gene encoding mitochondrial protein	0.87	0.05	
	NM_028388	Ndufv2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, nuclear gene encoding mitochondrial protein	0.89	0.04	
	NM_145518	Ndufs1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, nuclear gene encoding mitochondrial protein	0.81	0.09	
	NM_153064	Ndufs2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2	0.91	0.27	
	NM_144870	Ndufs8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8	0.88	0.01	
	NM_026219	Uqcrb	Ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein, nuclear gene encoding mitochondrial protein	0.88	0.00	
	NM_025650	Uqcr	Ubiquinol-cytochrome c reductase (6.4kD) subunit	0.91	0.11	
	NM_025710	Uqcrl1	Ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	0.76	0.03	
	COX3-315	mt-COX3	COX3 cytochrome c oxidase III, mitochondrial	0.71	0.12	
	NM_009941	Cox4i1	Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	0.80	0.04	
	NM_007747	Cox5a	Cytochrome c oxidase, subunit Va, nuclear gene encoding mitochondrial protein	0.85	0.03	
	NM_009942	Cox5b	Cytochrome c oxidase, subunit Vb	0.84	0.10	
	NM_007748	Cox6a1	Cytochrome c oxidase, subunit VI a, polypeptide 1, nuclear gene encoding mitochondrial protein	0.89	0.13	
	Energy production	NM_009943	Cox6a2	Cytochrome c oxidase, subunit VI a, polypeptide 2, nuclear gene encoding mitochondrial protein	0.77	0.07
		NM_007807	Cybb	Cytochrome b-245, beta polypeptide	0.80	0.05
NM_016774		Atp5b	ATP synthase, H ⁺ transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit, nuclear gene encoding mitochondrial protein	0.83	0.14	
NM_020615		Atp5c1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1, nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	0.76	0.06	
NM_016920		Atp6v0a1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A1	0.85	0.05	
NM_033617		Atp6v0b	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit B	0.84	0.04	
NM_007509		Atp6v1b2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit B2	0.82	0.09	
NM_013477		Atp6v0d1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit D1	0.87	0.24	
NM_007510		Atp6v1e1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit E1	0.87	0.06	
NM_025381		Atp6v1f	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit F	0.84	0.07	
NM_133826		Atp6v1h	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit H	0.89	0.31	
NM_009463		Ucp1	Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier), nuclear gene encoding mitochondrial protein	0.80	0.04	
NM_011671		Ucp2	Uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier), nuclear gene encoding mitochondrial protein	0.81	0.08	
NM_009464	Ucp3	Uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier), nuclear gene encoding mitochondrial protein	0.85	0.11		
Anti-oxidation	NM_008182	Gsta2	Glutathione S-transferase, alpha 2	1.28	0.01	
	NM_010357	Gsta4	Glutathione S-transferase, alpha 4	1.11	0.26	
	NM_008160	Gpx1	Glutathione peroxidase 1	1.30	0.08	
	NM_030677	Gpx2	Glutathione peroxidase 2	0.80	0.08	
	NM_008161	Gpx3	Glutathione peroxidase 3	0.88	0.09	

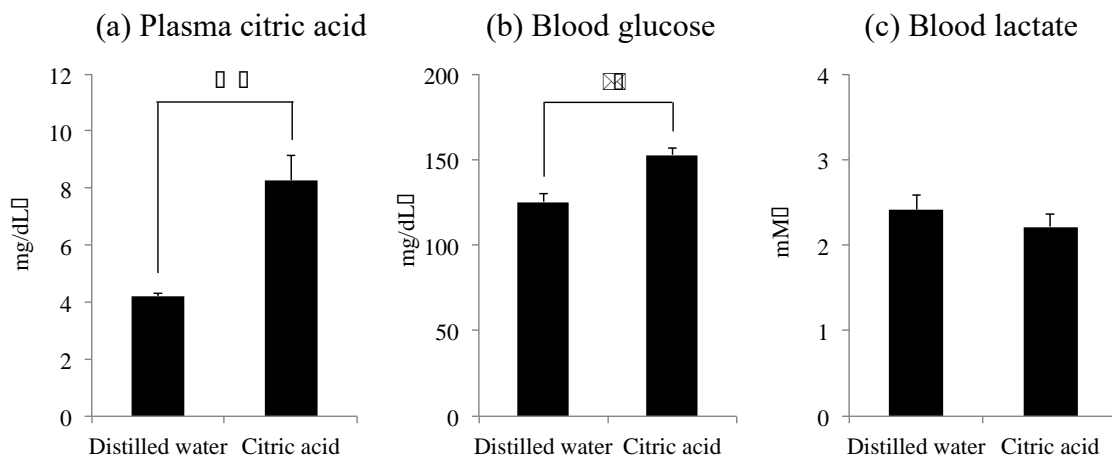


Fig. 1-9 The levels of (a) plasma citric acid, (b) blood glucose, (c) blood lactate

These figures show plasma citric acid, blood glucose, and blood lactate levels of C57BL/6J mice after citric acid intake. Data are means \pm SE (n = 6). Statistical significance was determined by Student's t-test. Asterisks represent significant differences (*P < 0.05).

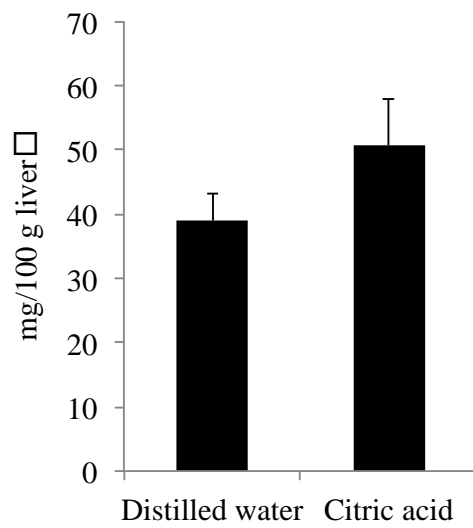


Fig. 1-10 Liver glycogen levels

This figure shows liver glycogen levels of C57BL/6J mice after citric acid intake. Data are means \pm SE (n = 6).

4. 考察

本節では、クエン酸の疲労軽減メカニズム、すなわち、クエン酸は糖新生を亢進するのか、また炎症を抑制するのか明らかにすることを目的とし、クエン酸を投与したマウス肝臓を用いてフォーカストアレイ解析を実施した。その結果、第1節の結果と同様に、クエン酸投与により血糖値が有意に高値を示し、糖新生が亢進する可能性が示された。しかし、糖新生の律速酵素である phosphoenolpyruvate carboxykinase1 (*Pck1*) および glucose-6-phosphatase (*G6pc*) の遺伝子発現は変化しなかった。24時間絶食したラットでは PCK1 の活性が腎臓で高まっており、長時間の絶食時には腎臓も糖新生に重要な役割を果たすことが報告されている (Sano et al. 1986)。本研究では、20時間絶食したマウスを用いたため、肝臓での糖新生は両群共に最大に活性化しており、クエン酸投与の影響がみられなかったと考えられる。本節では、クエン酸投与により糖新生が亢進する可能性が改めて示されたが、肝臓で糖新生が生じることを遺伝子発現レベルでは明らかにすることはできなかった。

また、第1節にてクエン酸投与によりグリコーゲン分解酵素の遺伝子発現が上昇したことから、本節では肝臓のグリコーゲン量を測定したが、クエン酸投与群の肝臓グリコーゲン量は、有意差はみられなかったものの蒸留水投与群と比較して130%に上昇していた ($P = 0.19$)。クエン酸の投与が運動後に減少した肝臓および骨格筋のグリコーゲンの補完を促進することがラットを用いた試験にて報告されていることから (Saitoh et al. 1983)、クエン酸投与がグリコーゲン量を上昇させる可能性が示された。一方で、第1節にてクエン酸投与によりグリコーゲン分解酵素の遺伝子発現が上昇していたのは、グリコーゲン量の増加に対する反応であると考えられる。

第1節のマウス骨格筋の試験では、クエン酸の疲労軽減効果は、解糖系の抑制に伴う乳酸蓄積抑制、TCA 回路・電子伝達系の活性化などを介していないことが示唆されたが、本節の肝臓を用いた試験においても、解糖系の律速酵素である glucokinase (*Gck*)、phosphofructokinase (*Pfk1*)、pyruvatekinase (*Pklr*) の遺伝子発現は変化しなかった。また、この時、血中乳酸値も変化していなかった。以上より、クエン酸投与が解糖系を阻害することにより乳酸の蓄積を抑制する可能性は低いことが示された。

第1節では、ミトコンドリア内のエネルギー産生関連遺伝子にはほとんど変化がみられなかったが、本節の肝臓を用いた試験では、28個のミトコンドリア内のエネルギー産生関連遺伝子は、クエン酸投与により減少した。したがって、クエン酸の投与は肝臓

においてもエネルギー産生を亢進しないことが示唆された。

第1節の骨格筋を用いた試験では、クエン酸投与により炎症関連受容体遺伝子の発現が減少することが示されたが、本節においてもクエン酸投与により interleukin 6 (*IL-6*) の遺伝子発現が減少し、クエン酸投与が炎症を抑制する可能性が示された。クエン酸投与は、高血糖条件下で炎症を誘導したヒト臍帯静脈内皮細胞の炎症を抑制することや (Bryland et al. 2012)、リポポリサッカライドにより炎症を誘導したマウスの脳と肝臓の脂質過酸化と炎症を抑制することが報告されており (Abdel-Salam et al. 2014)、本研究の結果もこれらの報告と一致している。

また、本節では、クエン酸投与により、主に細胞外に存在する glutathione peroxidase 2 (*Gpx2*)、*Gpx3* の遺伝子発現は減少したものの、細胞内に最も豊富なアイソザイムである *Gpx1* は上昇していた。さらに、glutathione S-transferase, alpha 2 (*Gsta2*)、*Gsta4* も上昇していたことから、クエン酸投与により、肝臓の抗酸化能が上昇する可能性が示された。上述のように、クエン酸の投与が脳および肝臓の過酸化脂質の生成を抑制することがマウスを用いた試験にて明らかにされているが (Abdel-Salam et al. 2015; Abdel-Salam et al. 2014)、そのメカニズムの1つとして *Gpx* や *Gsta* の上昇を挙げることができた。さらに、Abdel-Salam らは抗酸化作用を発揮するクエン酸の投与量についても検討しており、マウスへのクエン酸の投与は、1~2 g/kg では抗炎症、抗酸化作用が得られるが、4 g/kg では逆に炎症促進作用を示す可能性があるとして述べている。本実験ではマウスに 20 mg/30g、すなわち、約 670 mg/kg 投与していることから、本実験のクエン酸の投与量は、炎症や酸化を抑制する可能性がある適正量であると考えられる。

本節では、クエン酸の疲労軽減メカニズムを明らかにすることを目的とし、クエン酸を投与したマウスの肝臓の遺伝子発現をフォーカストアレイにより検討した。その結果、クエン酸投与による疲労軽減効果は、解糖系や TCA 回路、電子伝達系などの活性化によるものではなく、糖新生の亢進や炎症抑制、抗酸化効果によるものである可能性が明らかになった。

小括

呼吸器疾患における疲労感には低酸素状態が関連していると考えられる。第1章では、低酸素状態により生じる糖質代謝の変化や炎症に対してクエン酸が有効である可能性を探るため、マウスの骨格筋と肝臓を用いてクエン酸投与による遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。

第1節では、マウス骨格筋の遺伝子発現を網羅的に解析し、クエン酸投与が糖質代謝および炎症に与える影響について検討した。これまで、クエン酸の疲労軽減メカニズムとしては、解糖系の抑制による血中の乳酸蓄積の抑制、ミトコンドリア内膜でのATP産生の増加、グリコーゲンの補完などが挙げられてきた。しかし、第1節の結果、クエン酸投与による疲労軽減には、*Pck1*の遺伝子発現の上昇を介した糖新生の亢進と炎症の抑制が関与している可能性が示された。

第2節では、マウス肝臓を用いてクエン酸投与による遺伝子発現変動を網羅的に解析した。その結果、クエン酸の投与は、第1節の骨格筋を用いた試験と同様、解糖系の遺伝子発現、TCA回路や電子伝達系などのミトコンドリア内の遺伝子発現に変化を与えなかった。糖新生の律速酵素である*Pck1*の遺伝子発現に変化はみられなかったものの血糖値は有意に上昇しており、クエン酸の投与が糖新生を亢進する可能性が改めて示された。また、クエン酸投与が炎症抑制作用と抗酸化作用を有する可能性も示された。したがって、第2節においても第1節と同様、クエン酸の疲労軽減効果は、糖新生亢進や炎症抑制、さらには抗酸化によるものである可能性が示された。

以上、第1節、第2節のマウス骨格筋および肝臓を用いたクエン酸の生理機能の網羅的解析により、クエン酸投与は糖新生を亢進し、炎症や脂質過酸化を抑制することで疲労感を軽減させる可能性が示された。呼吸器疾患における疲労感には、低酸素状態による糖質代謝の変化や炎症誘導が関与している可能性があると考えられるため、本章ではクエン酸が呼吸器疾患に対して有益な食品成分となりうる可能性が示された。

第2章 低酸素曝露がラットの糖質代謝に及ぼす影響とクエン酸投与の有効性 -肝臓および骨格筋を用いた検討-

1. 緒言

生体の低酸素状態は、COPDなどの呼吸器疾患により引き起こされる。低酸素状態では、呼吸の調節のみならず、脳、心臓、骨格筋、腎臓、肝臓など様々な臓器での代謝変化や炎症が誘導されることがわかっており (Majmundar et al. 2010)、COPD患者の疲労感と深く関わっていると考えられる。これまで、ヒトやラットを用いた試験において、高地などの低酸素環境下では糖の利用が高まることが報告されている (Kelly et al. 2010; Brooks et al. 1991; Freminet 1981)。また、低酸素曝露したマウスやラットでは肝臓グリコーゲン量が減少するとの報告もあることから (Katsumata et al. 1984; Freminet 1981; Purshottam et al. 1977; Ou 1974; Blume and Pace 1967)、低酸素環境下での血糖の維持には、肝臓グリコーゲンの分解が重要であると推察される。一方で、第1章では、クエン酸投与は糖新生を亢進する可能性と炎症を抑制する可能性が示されたことから、クエン酸投与は、低酸素により生じる低血糖や炎症を抑制することが期待される。

そこで本章では、酸素濃度 10.5%で2時間の低酸素曝露を行ったラットの肝臓とヒラメ筋を用いて、低酸素曝露時の糖質代謝の変化に対するクエン酸投与の影響について検討することを目的とした。

ラットに低酸素曝露を行うにあたり、酸素濃度や時間などの条件設定は重要である。低酸素に関する研究の多くは細胞を用いたものであり、実験動物を用いた報告は少ない。そこで、本章では、数少ない実験動物を用いた報告の中でもよく用いられている条件であり、moderateな条件といわれている酸素濃度 10.5%とした (Cahan et al. 1990)。Hochachkaらは、低酸素に対する適応反応を制御する遺伝子発現の変動は、酸素欠乏後、約80分以降に生じると報告している (Hochachka et al. 1996)。したがって、本研究では酸素濃度を 10.5%に低下させた時点から90分間の低酸素曝露を行うこととした。

2. 方法

2.1 実験動物とプロトコール

8週齢の雄性 Sprague-Dawley ラット (SD ラット) を日本チャールス・リバー (株) より購入した。ラットは、飼育温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、12 時間明暗サイクル (明期 8:00~20 時、暗期 20:00~8:00) の環境下にて、プラスチックケージで個別飼育した。市販の固形飼料 (CRF-1: 日本チャールス・リバー (株)) にて 1 週間予備飼育した後、各群の体重が等しくなるように、常酸素群 (Normoxia: Control)、クエン酸投与群 (Normoxia + Citric acid)、低酸素群 (Hypoxia)、低酸素+クエン酸投与群 (Hypoxia + Citric acid) の 4 群に分けた ($n = 7$)。一晩絶食後、曝露開始 30 分前に蒸留水またはクエン酸溶液をゾンデにて胃内投与した (常酸素群: 蒸留水、クエン酸投与群: クエン酸溶液、低酸素群: 蒸留水、低酸素+クエン酸投与群: クエン酸溶液)。酸素濃度は、常酸素群 21.0%、低酸素群 10.5%とした。低酸素群および低酸素+クエン酸投与群は、酸素濃度 21.0%、17.5%、15.0%、10.5%時に呼吸数を目視により測定した。クエン酸溶液は、ラットの体重 300 g あたりクエン酸 200 mg となるように蒸留水で希釈した (クエン酸 200 mg/3 mL/300 g body weight)。曝露開始 30 分で 21.0%から 10.5%まで酸素濃度を下げ、その後 90 分間低酸素曝露し、曝露開始 2 時間後、イソフルラン麻酔下にて腹大動脈から血液を得た。血液を遠心分離 ($1,900 \times g$, 10 分) し、採取した血漿は分析まで -30°C にて冷凍保存した。解剖時には、肝臓、ヒラメ筋を摘出し、重量を測定した。肝臓およびヒラメ筋の一部は、1 辺 0.5 cm 以下にカットし直ちに RNAlater (キアゲン (株)) に浸漬し、総 RNA 抽出まで -80°C で保存した。残りの肝臓およびヒラメ筋の小片は液体窒素で凍結させ、 -30°C で保存した。

本研究は、昭和女子大学実験動物倫理委員会の承認を得た後 (承認番号: 14-03)、動物実験倫理規定に従い実施した。

2.2 血液生化学分析

2.2.1 血漿クエン酸濃度の測定

血漿クエン酸濃度の測定は、第 1 章 第 1 節 2.3.1 と同様に行った。

2.2.2 血糖値と血中乳酸値の測定

血糖値および血中乳酸値は、第 1 章 第 1 節 2.3.2 と同様に測定した。

2.2.3 血漿遊離脂肪酸の測定

血漿遊離脂肪酸は、NEFA C-テストワコー（和光純薬工業（株））を用いて測定した。

2.3 肝臓とヒラメ筋中グリコーゲン量の測定

肝臓およびヒラメ筋中グリコーゲン量は、第1章 第2節 2.4と同様に測定した。

2.4 肝臓およびヒラメ筋の遺伝子発現量解析

2.4.1 total RNA の抽出

肝臓の total RNA の抽出は、第1章 第2節 2.2.1と同様に行った。ヒラメ筋の total RNA は、解剖時に RNAlater に浸漬し-80°Cで冷凍保存しておいたヒラメ筋約 25 mg を用いて、RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit(キアゲン(株))により抽出した。total RNA の純度は、分光光度計で 260 nm/280 nm の比が 1.8~2.0 の範囲に収まっていることを確認した。

2.4.2 逆転写反応 (complementary DNA (cDNA) の合成)

逆転写反応には PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ(株))を用いた。逆転写反応液は、5×PrimeScript Buffer (for Real Time)、PrimeScript RT Enzyme Mix I、Oligo dT Primer、Random 6 mers、total RNA 800 ng を添加し、RNase Free dH₂O を加え、最終液量を 20 μL とした。ドライブロックインキュベータ BSR-MK2000-2E (バイオメディカルサイエンス(株))を用いて、37°C で 15 分、85°C で 5 秒間反応させ cDNA 液を得た。cDNA 液は実験まで-80°Cで保存した。

2.4.3 リアルタイム PCR による遺伝子発現量解析

mRNA 発現量の測定には real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いた。反応には、PowerSYBR Green PCR Master Mix (Applied biosystems) を用い、測定遺伝子の forward および reverse プライマーの最終濃度は 100 nM になるようにした。反応に用いた cDNA は 10 ng となるように調製した。PCR と融解曲線の作製は Applied Biosystems 7500 real-time PCR system (Applied biosystems) を用いて行った。反応は、stage 1 : 95°C 10 分、stage 2: 95°C

15秒でDNAを変性させ、60°C、1分でアニーリング・伸長を1サイクルとし、40サイクル反応させた後、融解曲線を作成し、単一の生成物であることを確認した。各遺伝子の発現量は $\Delta\Delta CT$ 法を用いて内因性遺伝子（housekeeping 遺伝子）に対する発現量を求めた。Housekeeping 遺伝子には β -actin を用いた。肝臓サンプルに使用したプライマーの一覧は Table 1、ヒラメ筋サンプルに使用したプライマーの一覧は、Table 2 に示した。

2.5 ウェスタンブロットによる肝臓およびヒラメ筋の HIF-1 α の測定

2.5.1 総タンパク質の抽出および測定

肝臓およびヒラメ筋中の総タンパク質の抽出には、3-min Total Protein Extraction Kit (for Animal Tissues) (コスモバイオ (株)) を用いた。-30°Cにて冷凍保存していた肝臓およびヒラメ筋を 15~20 mg 使用した。抽出液の総タンパク質濃度は、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) を用いて算出した。

2.5.2 電気泳動 (sodium dodecyl sulfate - poly-acrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

2.5.1 で抽出した総タンパク質は、Red Loading buffer Pack (BioLabs) を用いて 95°C、5分間加熱し、SDS還元処理を行った。タンパク質の量は、肝臓 30 μ g、ヒラメ筋 15 μ g となるようにアプライし、ゲル1枚あたり 20 mA で 60分間電気泳動を行った。ポリアクリルアミドゲルは、スーパーセップ™エース 7.5% 17 well (和光 (株)) を用いた。泳動バッファーは、泳動用緩衝液 ($\times 10$) (和光純薬工業 (株)) を用いた。

2.5.3 転写およびブロッキング

電気泳動終了後、イモビロン-P メンブレン (poly vinylidene difluoride, PVDF) (Melck Millipore Corp.) に転写した (117 mA、30分)。転写バッファーには、EzBlot (アトー (株)) を用いた。転写後、肝臓サンプルは 5%スキムミルク (0.1% Tween-TBS にて溶解)、ヒラメ筋サンプルは 3% BSA (0.1% Tween-TBS にて溶解) 溶液中で、室温で 1時間振盪し、ブロッキングを行った。

2.5.4 抗原抗体反応

ブロッキング後、0.1% Tween-TBS で軽く洗浄した。一次抗体は β -actin (rabbit polyclonal antibody, Cell Signaling Inc.) と HIF-1 α (rabbit monoclonal antibody, GeneTex Inc.)、二次抗体は anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (Cell Signaling Inc.) を用いた。一次抗体は、肝臓サンプルは 5% BSA (0.1% Tween TBS で希釈)、ヒラメ筋サンプルは 1% BSA (0.1% Tween-TBS で希釈) でそれぞれ 1000 倍希釈し、4°Cで一晩振盪した。一次抗体反応後 1% Tween-TBS で 3 回洗浄した (5 分×1 回、10 分×2 回)。二次抗体は、両臓器とも、5%スキムミルク (0.1% Tween-TBS にて溶解) で 2000 倍希釈し、室温で 1 時間振盪した後、一次抗体反応後と同様に洗浄した。その後、イムノスターゼータ (和光 (株)) を転写面にかけて 5 分間化学発光させ、C-DiGit (エムエステクノシステムズ (株)) で 12 分間検出し、 β -actin に対する HIF-1 α の発光量の相対比を算出した。

2.6 統計

データは全て平均値±標準誤差で示した。クエン酸および低酸素曝露の効果について、クエン酸投与と低酸素曝露の交互作用を因子とする二元配置分散分析を実施した。また、二元配置分散分析の結果、交互作用が有意であった場合には、Tukey の多重比較検定を実施した。P < 0.05 の時、有意差ありとした。

Table 1. Gene names, gene symbols, and primer sequences used in the real-time PCR of liver samples

Gene name	Gene symbol	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
Glucose uptake			
<i>Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (Slc2a1)</i>	<i>GLUT1</i>	GACCCTGCATCTGATTGGTCTG	CCACAATGAACCATGGAATAGGA
<i>Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2 (Slc2a2)</i>	<i>GLUT2</i>	TTGGTGCCATCAACATGATCTTC	AGATGGCCGTCATGCTCACATA
Glycolysis			
<i>Glucokinase</i>	<i>Gck</i>	AGTATGACCGGATGGTGGATGAA	CCAGCTTAAGCAGCACAAAGTCGTA
<i>Phosphofructokinase</i>	<i>Pfk1</i>	CCACCTGGAGGCCATGATGA	GGGATGACGCACATGACGA
<i>Pyruvate kinase</i>	<i>Pfkfb</i>	ATCTGGGCAGATGATGTGGA	ATAGGGTGTAAGTGGGTCAGAATGG
<i>Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1</i>	<i>Pdk1</i>	AGAATGCGAGACGGCTTTGTG	ACGCCTTTGTCTGCATGGTG
<i>Lactate dehydrogenase A</i>	<i>Ldha</i>	CTGATGAGCTTGCCCTTGTGA	CGGTGATAATGACCAGCTTGA
Glycogen metabolism			
<i>Glycogen synthase 2</i>	<i>Gys2</i>	CATGAATGGCAGGCTGGAAC	GCTCCATGCAGTAGCGGTGA
<i>Glycogen phosphorylase</i>	<i>Pygl</i>	GATCCGCACACAGCAGCACTA	CTTCGTGCGCAGGCATTCTGTAA
Gluconeogenesis			
<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1</i>	<i>Pck1</i>	CAGCCAATGTCCATTATTGACC	TGCCAGCTGAGAGCTTCGTAGA
<i>Glucose-6-phosphatase</i>	<i>G6pc</i>	TTAGAGGCAAGGAGCCCAAG	GGGTGGAAACACAGGCATCA

Table 2. Gene names, gene symbols, and primer sequences used in the real-time PCR of soleus muscle samples

Gene name	Gene symbol	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
Glucose uptake			
<i>Solute carrier family 4 (facilitated glucose transporter), member 4 (Slc2a4)</i>	<i>GLUT4</i>	CTCCAACCTGGACCTGTAACCTTCATC	GCCTCTGGTTTCAGGCACTC
Glycolysis			
<i>Hexokinase 1</i>	<i>Hk1</i>	ATTGTCGCCGTGGTGAATGA	TAGCAAGCATTGGTGCCTGTG
<i>Hexokinase 2</i>	<i>Hk2</i>	TCGATGGCTCCGTCTACAAGAA	ACATCACAGTCGGGCACCAG
<i>Phosphofructokinase</i>	<i>Pfkm</i>	GGGCTGACACAGCACTGAACA	GGCCAGATAGCCACAGTAACCAC
<i>Pyruvate kinase</i>	<i>Pkm</i>	TGTTTAGCAGCAGCTTTGATAGTTC	GCGTGTCACAGCAATGATAGGAG
<i>Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1</i>	<i>Pdk1</i>	AGAATGCGAGACGGCTTTGTG	ACGCCTTTGTCTGCATGGTG
<i>Lactate dehydrogenase A</i>	<i>Ldha</i>	CTGATGAGCTTGCCCTTGTGA	CGGTGATAATGACCAGCTTGGA
Glycogen metabolism			
<i>Glycogen synthase 1</i>	<i>Gys1</i>	TCAGAGCAAAGCACGAATCCAG	AACTCATAGCGTCCAGCGATAAAGA
<i>Glycogen phosphorylase</i>	<i>Pygm</i>	TCCGCACACAGCAGCATTACTAC	TCCAAGGCCAGGTTACCA
Gluconeogenesis			
<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1</i>	<i>Pck1</i>	CAGCCAATGTCCATTATTGACC	TGCCAGCTGAGAGCTTCGTAGA

3. 結果

3.1 呼吸数

低酸素曝露時のラットの呼吸数を Fig. 2-1 に示した。低酸素群の1分間あたりの呼吸数は、低酸素曝露直前の酸素濃度 21.0%では 96 ± 5 回、17.5%で 114 ± 10 回、15.0%で 119 ± 8 回、10.5%で 168 ± 7 回であり、21.0%時の呼吸数と比較して、15.0%、10.5%時の呼吸数は有意に多かった。低酸素+クエン酸投与群の1分間あたりの呼吸数は、低酸素曝露直前の酸素濃度 21.0%では 93 ± 5 回、17.5%で 111 ± 9 回、15.0%で 130 ± 13 回、10.5%で 162 ± 6 回であり、21.0%時の呼吸数と比較して、15.0%、10.5%時の呼吸数は有意に多かった。低酸素群と低酸素+クエン酸投与群間には、呼吸数に有意な差はみられなかった。

3.2 血漿クエン酸濃度

血漿クエン酸濃度は、常酸素群 3.0 ± 0.1 mg/dL、クエン酸投与群 4.6 ± 0.2 mg/dL、低酸素群 3.5 ± 0.1 mg/dL、低酸素+クエン酸投与群 5.0 ± 0.2 mg/dL だった (Fig. 2-2 (a))。二元配置分散分析の結果、交互作用は有意ではなく、クエン酸投与と低酸素曝露の主効果が有意であった。

3.3 血糖値と血中乳酸値

血糖値は、常酸素群 139 ± 7 mg/dL、クエン酸投与群 145 ± 8 mg/dL、低酸素群 136 ± 6 mg/dL、低酸素+クエン酸投与群 150 ± 7 mg/dL で、二元配置分散分析の結果、クエン酸投与と低酸素曝露の交互作用および主効果は認められなかった (Fig. 2-2 (b))。血中乳酸値は、常酸素群 2.0 ± 0.1 mM、クエン酸投与群 1.8 ± 0.1 mM、低酸素群 1.4 ± 0.1 mM、低酸素+クエン酸投与群 1.3 ± 0.1 mM であった (Fig. 2-2 (c))。二元配置分散分析の結果、交互作用は有意ではなく、低酸素曝露の主効果が有意であった。

3.4 血漿遊離脂肪酸濃度

血漿遊離脂肪酸濃度は、常酸素群 0.75 ± 0.05 mEq/L、クエン酸投与群 0.68 ± 0.05 mEq/L、低酸素群 0.70 ± 0.05 mEq/L、低酸素+クエン酸投与群 0.52 ± 0.04 mEq/L であった (Fig. 2-3)。二元配置分散分析の結果、交互作用は有意ではなく、クエン酸投与と低酸素曝露の主効果が有意であった。

3.5 肝臓とヒラメ筋中グリコーゲン量

肝臓グリコーゲン量は、湿重量 100 g あたり、常酸素群 42.4 ± 6.4 mg、クエン酸投与群 55.9 ± 7.5 mg、低酸素群 26.6 ± 5.1 mg、低酸素+クエン酸投与群 47.2 ± 10.1 mg であった (Fig. 2-4 (a))。二元配置分散分析の結果、交互作用は有意ではなく、クエン酸投与の主効果が有意であり、肝臓グリコーゲン量はクエン酸投与により増加することが示された。ヒラメ筋中グリコーゲン量は、湿重量 100 g あたり、常酸素群 8.4 ± 0.4 mg、クエン酸投与群 8.6 ± 0.3 mg、低酸素群 8.9 ± 0.4 mg、低酸素+クエン酸投与群 9.6 ± 0.4 mg であった (Fig. 2-4 (b))。二元配置分散分析の結果、交互作用は有意ではなく、クエン酸投与および低酸素曝露の主効果もみられなかった。

3.6 肝臓の遺伝子発現量解析

3.6.1 糖取込みと解糖系に関わる遺伝子発現量

糖取込みに関わる glucose transporter 1 (*GLUT1*)、glucose transporter 2 (*GLUT2*) の遺伝子発現比を Fig. 2-5 に示した。*GLUT1* は低酸素+クエン酸投与群 > 低酸素群 > クエン酸投与群 > 常酸素群の順に高値を示した。二元配置分散分析の結果、交互作用が有意であった。Tukey の多重比較検定の結果、*GLUT1* の遺伝子発現比は、低酸素群が常酸素群と比較して有意に高く、低酸素+クエン酸投与群は他の 3 群と比較して有意に高値を示した。*GLUT2* も *GLUT1* と同様に、低酸素+クエン酸投与群 > 低酸素群 > クエン酸投与群 > 常酸素群の順に高値を示した。二元配置分散分析の結果、交互作用はみられなかったが、クエン酸投与の主効果が有意であった。

解糖系の律速酵素である glucokinase (*Gck*)、phosphofructokinase (*Pfk1*)、pyruvate kinase (*Pk1r*) の遺伝子発現比を Fig. 2-6 に示した。*Gck* と *Pfk1* は、低酸素+クエン酸投与群 > 低酸素群 > クエン酸投与群 > 常酸素群の順に高値を示した。*Gck* と *Pfk1* の二元配置分散分析の結果、交互作用は有意ではなく、低酸素曝露の主効果が有意であった。*Pk1r*、pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1 (*Pdk1*)、lactate dehydrogenase A (*Ldha*) の遺伝子発現比は、二元配置分散分析の結果、交互作用および主効果に有意な差はみられなかった。(Fig. 2-6)。

3.6.2 グリコーゲン代謝に関わる遺伝子発現量

肝臓のグリコーゲン代謝に関わる glycogen synthase 2 (*Gys2*) と glycogen phosphorylase (*Pygl*) の遺伝子発現比を Fig. 2-7 に示した。グリコーゲン合成酵素である *Gys2* の遺伝子発現は、低酸素+クエン酸投与群 > 低酸素群 > クエン酸投与群 > 常酸素群の順に高値を示した。二元配置分散分析の結果、交互作用は有意ではなく、低酸素曝露の主効果が有意であり、低酸素曝露により *Gys2* の遺伝子発現比が高まることが示された。グリコーゲン分解酵素である *Pygl* の遺伝子発現は、低酸素+クエン酸投与群 > クエン酸投与群 > 低酸素群 > 常酸素群の順に高値を示した。二元配置分散分析の結果、交互作用は有意ではなく、クエン酸投与の主効果が有意であり、クエン酸の投与により *Pygl* の遺伝子発現比が高まることが示された。

3.6.3 糖新生に関わる遺伝子発現量

糖新生に関わる phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (*Pck1*) と glucose-6-phosphatase (*G6pc*) の遺伝子発現比を Fig. 2-8 に示した。*Pck1* の遺伝子発現比は、低酸素+クエン酸投与群 > 低酸素群 > 常酸素群 > クエン酸投与群の順に高値を示した。二元配置分散分析の結果、交互作用は有意ではなく、低酸素曝露の主効果が有意であった。*G6pc* の遺伝子発現比は、二元配置分散分析の結果、交互作用が有意であり、Tukey の多重比較検定の結果、低酸素+クエン酸投与群の *G6pc* の遺伝子発現比は、クエン酸投与群と低酸素群よりも有意に高値であった。

3.7 ヒラメ筋の遺伝子発現量解析

3.7.1 糖取込みと解糖系に関わる遺伝子発現量

糖取込みに関わる glucose transporter 4 (*GLUT4*) の遺伝子発現比は、二元配置分散分析の結果、交互作用は有意ではなく、クエン酸投与および低酸素曝露の主効果もみられなかった。(Fig. 2-9)。解糖系の律速酵素である hexokinase 1 (*Hk1*)、hexokinase 2 (*Hk2*)、phosphofructokinase (*Pfkm*) の遺伝子発現比は、二元配置分散分析の結果、交互作用は有意ではなく、クエン酸投与および低酸素曝露の主効果もみられなかった。

(Fig. 2-10)。Pyruvate kinase (*Pkm*) の遺伝子発現比は、二元配置分散分析の結果、交互作用が有意であった。Tukey の多重比較検定の結果、クエン酸投与群が常酸素群と比較して有意に低値を示した。一方で、低酸素+クエン酸投与群では、クエン酸投与群

よりも有意に高値であり、常酸素群との間には有意な差はみられなかった。Pyruvate dehydrogenase kinase1 (*Pdk1*)、lactate dehydrogenase A (*Ldha*) の遺伝子発現比は、二元配置分散分析の結果、交互作用は有意ではなく、クエン酸投与および低酸素曝露の主効果もみられなかった。(Fig. 2-10)。

3.7.2 グリコーゲン代謝に関わる遺伝子発現量

グリコーゲン代謝に関わる glycogen synthase 1 (*Gys1*) と glycogen phosphorylase (*Pygm*) の遺伝子発現比を Fig. 2-11 に示した。*Gys1* の遺伝子発現比は、二元配置分散分析の結果、交互作用は有意ではなく、クエン酸投与および低酸素曝露の主効果もみられなかった。*Pygm* の遺伝子発現比は、二元配置分散分析の結果、交互作用が有意であり、Tukey の多重比較検定の結果、クエン酸投与群の *Pygm* の遺伝子発現比は常酸素群と比較して有意に低値を示した。

3.7.3 糖新生に関わる遺伝子発現量

糖新生に関わる phosphoenolpyruvate carboxykinase1 (*Pck1*) の遺伝子発現比を Fig. 2-12 に示した。*Pck1* の遺伝子発現比は、低酸素+クエン酸投与群 > 低酸素群 > クエン酸投与群 > 常酸素群の順に高値を示した。二元配置分散分析の結果、交互作用は有意ではなく、低酸素曝露の主効果が有意だった。

3.8 低酸素誘導因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) のタンパク質発現比

肝臓では、HIF-1 α タンパク質は検出されなかった(データには示していない)。ヒラメ筋の HIF-1 α タンパク質の相対発現比は、常酸素群を 1 とした時、クエン酸投与群 0.72 ± 0.15 、低酸素群 0.69 ± 0.14 、低酸素+クエン酸投与群が 0.91 ± 0.26 であった (Fig. 2-13)。二元配置分散分析の結果、交互作用は有意ではなく、主効果もみられなかった。

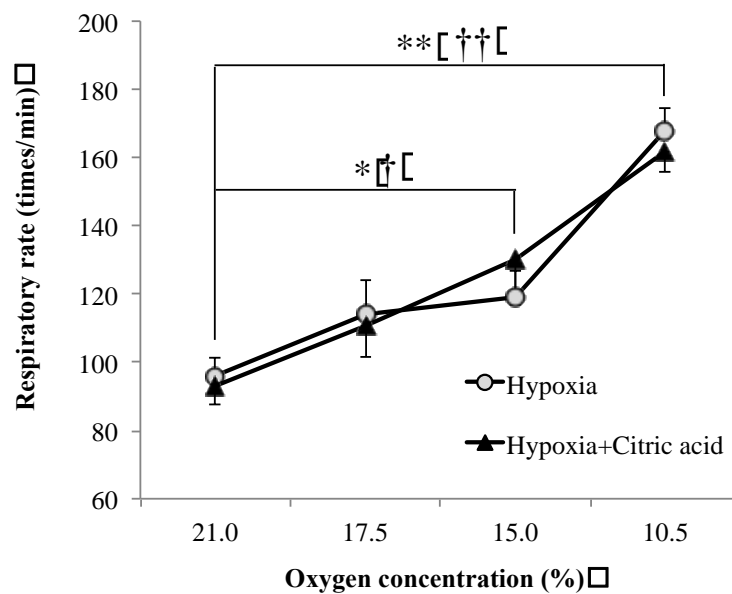


Fig. 2-1 Respiratory rate during hypoxic exposure

This figure shows respiratory rate of rats at the 21.0%, 17.5%, 15.0%, and 10.5% O₂. Data are means ± SE (n = 7). Double asterisks indicate significant difference between 21.0% and 10.5% in the Hypoxia group (**P < 0.01). Asterisk indicates significant difference between 21.0% and 15.0% in the Hypoxia group (*P < 0.05). Double daggers indicate significant difference 21.0% and 10.5% in the Hypoxia+Citric acid group (††P < 0.01). Dagger indicates significant difference 21.0% and 15.0% in the Hypoxia+Citric acid group (†P < 0.05).

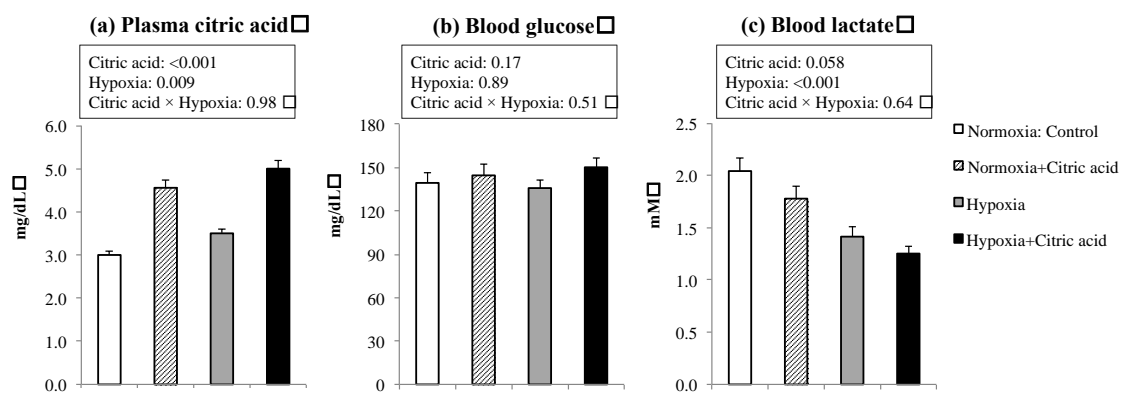


Fig. 2-2 The levels of (a) plasma citric acid, (b) blood glucose, (c) blood lactate

This figure shows plasma citric acid, blood glucose, and blood lactate levels in rats after hypoxic exposure for 2 hours. Data are means \pm SE (n = 7). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the boxes.

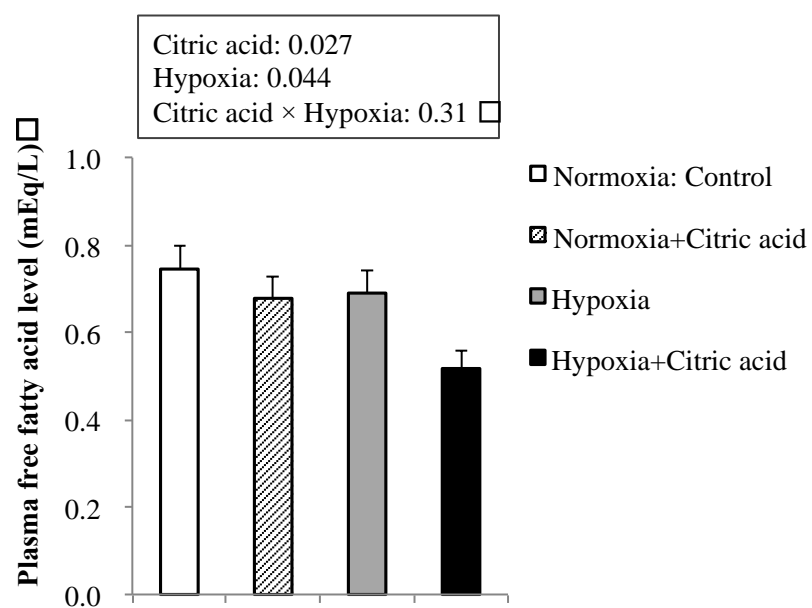


Fig. 2-3 Plasma free fatty acid levels

This figure shows plasma free fatty acid levels in rats after hypoxic exposure for 2 hours. Data are means \pm SE (n = 7). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the box.

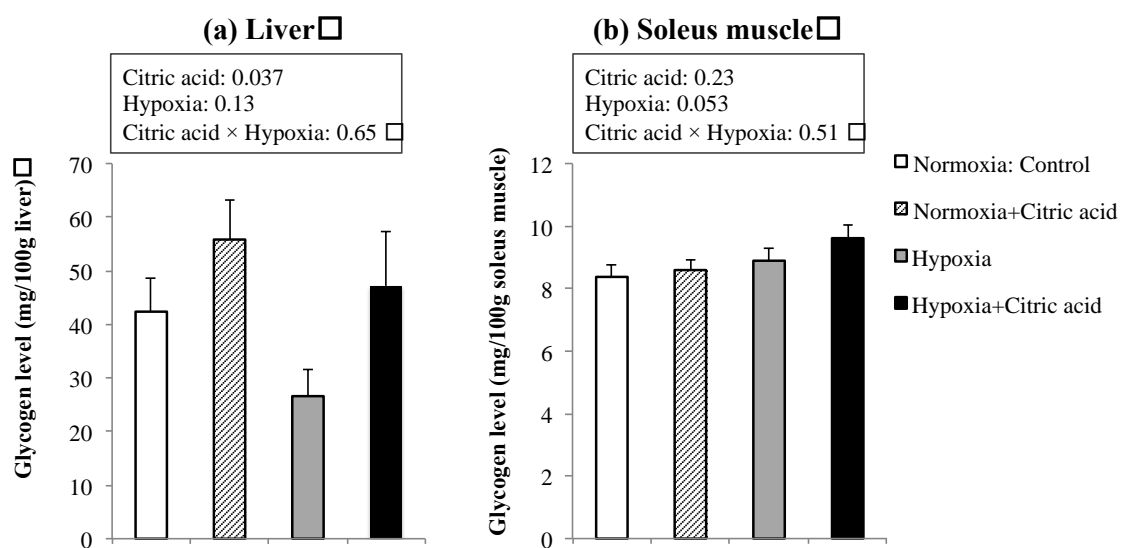


Fig. 2-4 The levels of (a) liver glycogen, (b) soleus muscle glycogen

This figure shows liver and soleus muscle glycogen levels in rats after hypoxic exposure for 2 hours. Data are means \pm SE (n = 7). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the boxes.

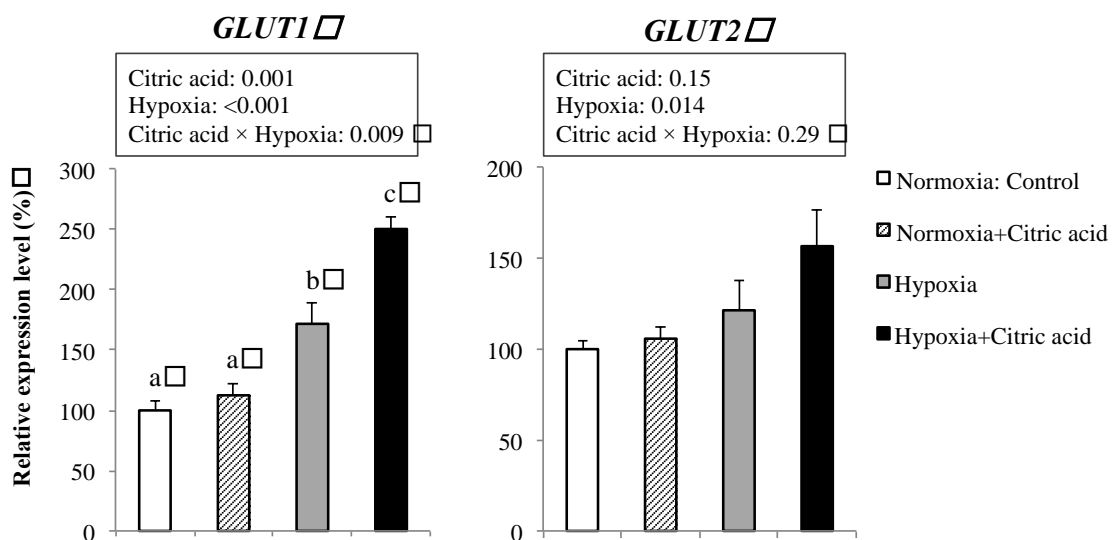


Fig. 2-5 Glucose transporter 1 (GLUT1) and glucose transporter 2 (GLUT2) mRNA expression levels in the liver

This figure shows relative mRNA expression levels of glucose uptake-related genes in the liver of rats after hypoxic exposure for 2 hours. Data are means \pm SE (n = 7). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the boxes. Means without a common letter are significantly different by Tukey's test (P < 0.05).

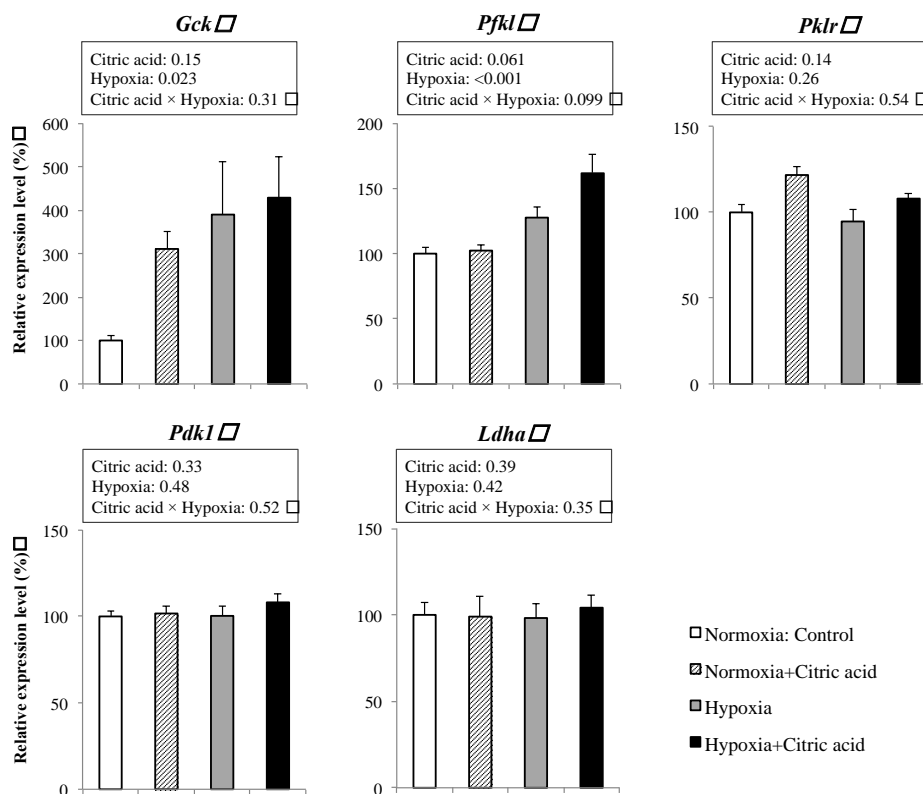


Fig. 2-6 Glucokinase (*Gck*), phosphofructokinase (*Pfkf*), pyruvate kinase (*Pklr*), pyruvate dehydrogenase kinase (*Pdk1*), and lactate dehydrogenase A (*Ldha*) mRNA expression levels in the liver

This figure shows relative mRNA expression levels of glycolysis-related genes in the liver of rats after hypoxic exposure for 2 hours. Data are means \pm SE (n = 7). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the boxes.

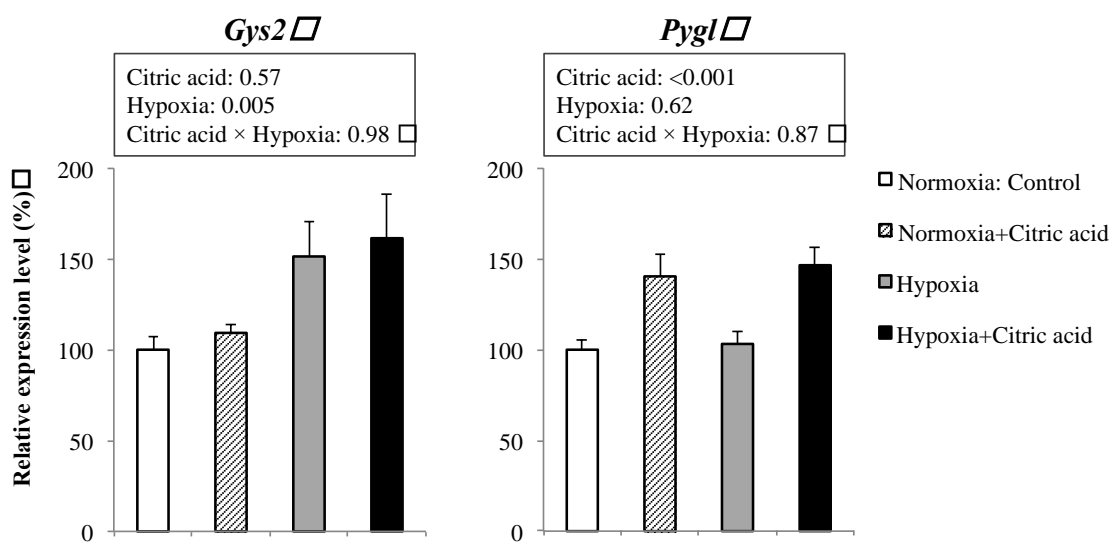


Fig. 2-7 Glycogen synthase 2 (*Gys2*) and glycogen phosphorylase (*Pygl*) mRNA expression levels in the liver

This figure shows relative mRNA expression levels of glycogen metabolism-related genes in the liver of rats after hypoxic exposure for 2 hours. Data are means \pm SE (n = 7). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the boxes.

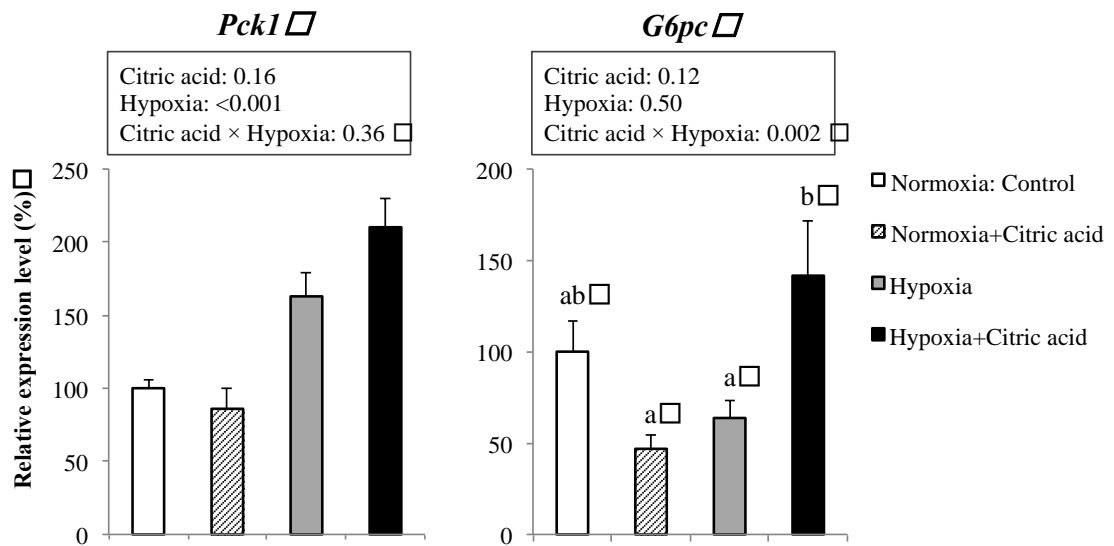


Fig. 2-8 Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (*Pck1*) and glucose-6-phosphatase (*G6pc*) mRNA expression levels in the liver

This figure shows relative mRNA expression levels of gluconeogenesis-related genes in the liver of rats after hypoxic exposure for 2 hours. Data are means \pm SE (n = 7). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the boxes. Means without a common letter are significantly different by Tukey's test (P < 0.05).

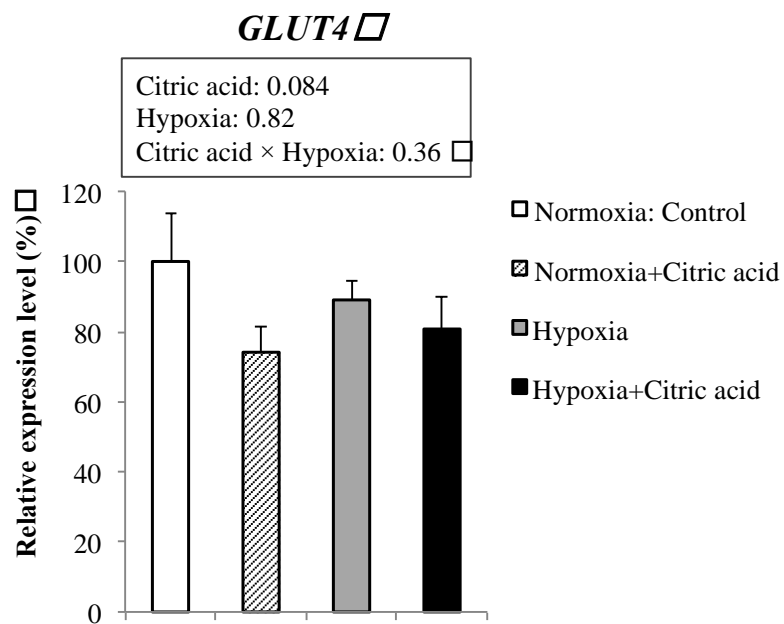


Fig. 2-9 Glucose transporter 4 (*GLUT4*) mRNA expression levels in the soleus muscle

This figure shows relative mRNA expression levels of glucose uptake-related genes in the soleus muscle of rats after hypoxic exposure for 2 hours. Data are means \pm SE (n = 7). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the box.

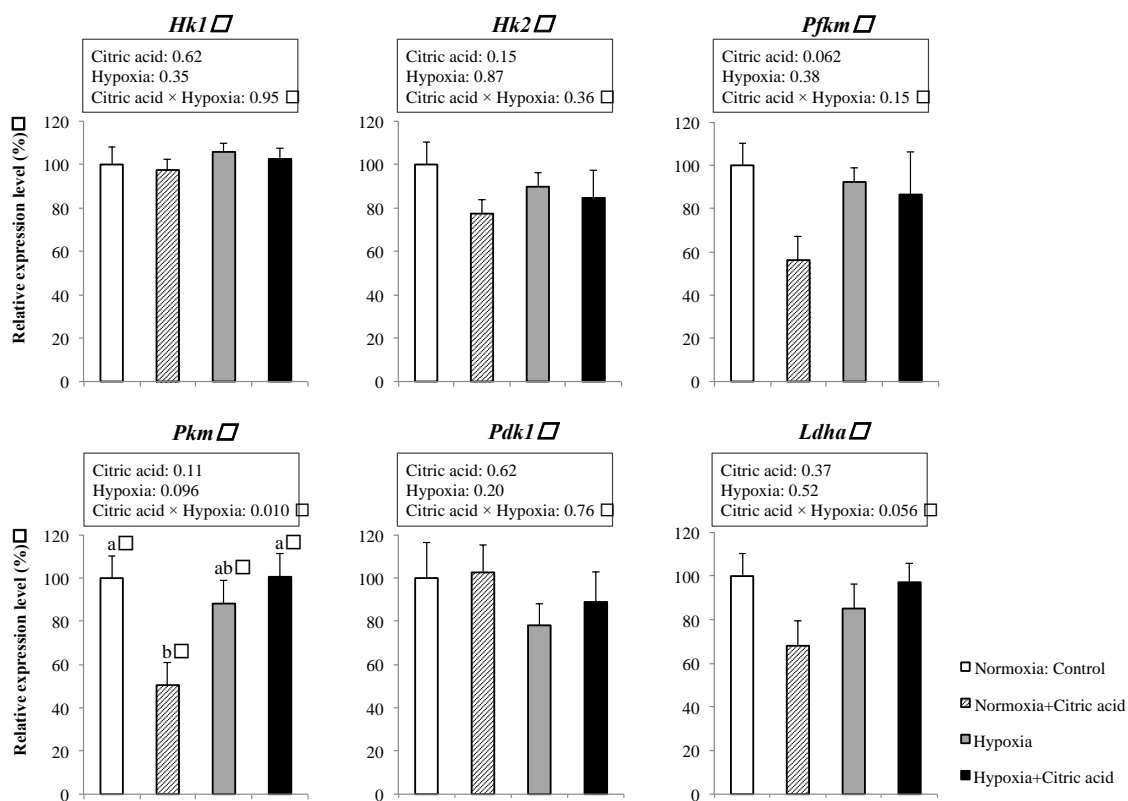


Fig. 2-10 Hexokinase 1 (*Hk1*), hexokinase 2 (*Hk2*), phosphofruktokinase (*Pfk1*), pyruvate kinase (*Pkm*), pyruvate dehydrogenase 1 (*Pdk1*), and lactate dehydrogenase A (*Ldha*) mRNA expression levels in the soleus muscle

This figure shows relative mRNA expression levels of glycolysis-related genes in the soleus muscle of rats after hypoxic exposure for 2 hours. Data are means \pm SE (n = 7). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the boxes. Means without a common letter are significantly different by Tukey's test (P < 0.05).

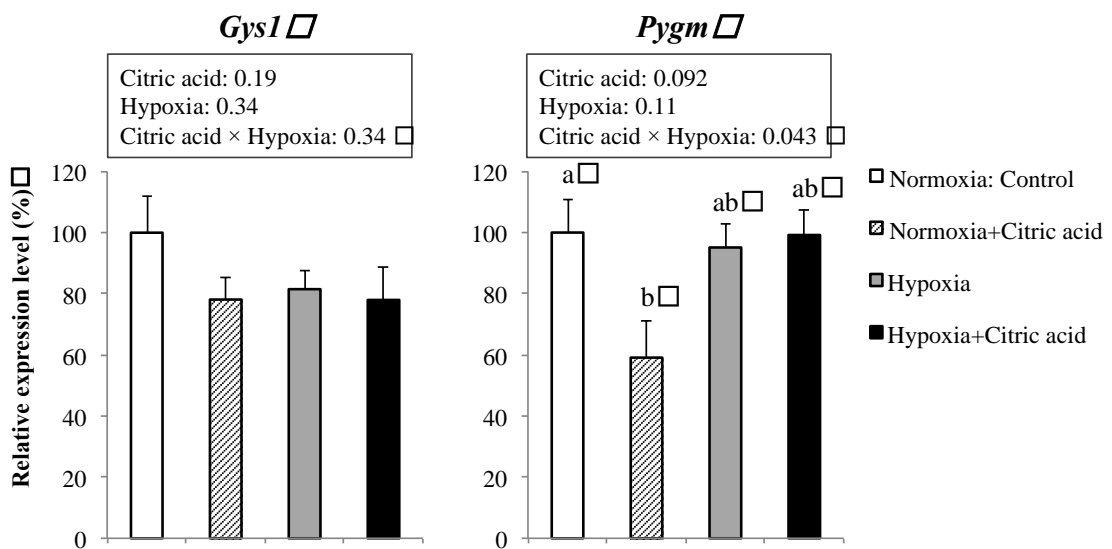


Fig. 2-11 Glycogen synthase 1 (*Gys1*) and glycogen phosphorylase (*Pygm*) mRNA expression levels in the soleus muscle

This figure shows relative mRNA expression levels of glycogen metabolism-related genes in the soleus muscle of rats after hypoxic exposure for 2 hours. Data are means \pm SE (n = 7). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the boxes. Means without a common letter are significantly different by Tukey's test (P < 0.05).

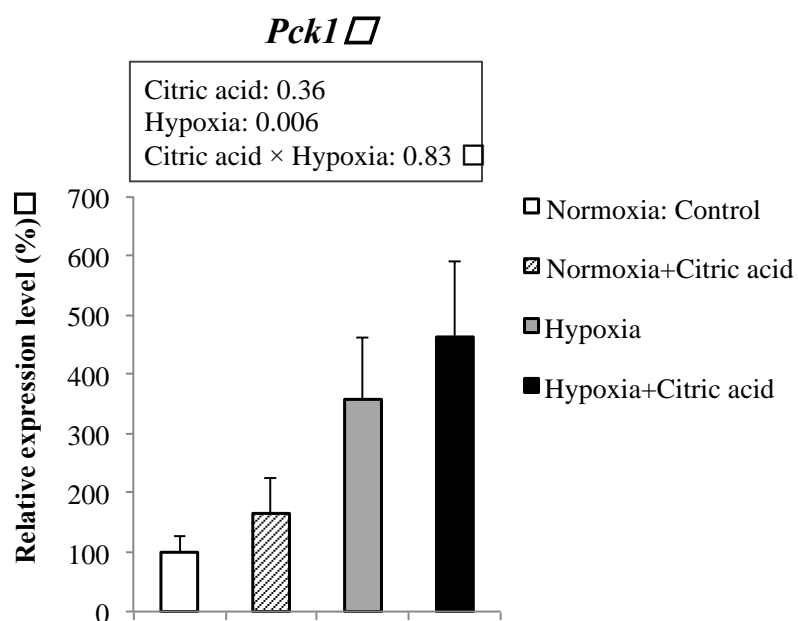


Fig. 2-12 Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (*Pck1*) mRNA expression levels in the soleus muscle

This figure shows relative mRNA expression levels of gluconeogenesis-related genes in the soleus muscle of rats after hypoxic exposure for 2 hours. Data are means \pm SE (n = 7). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the box.

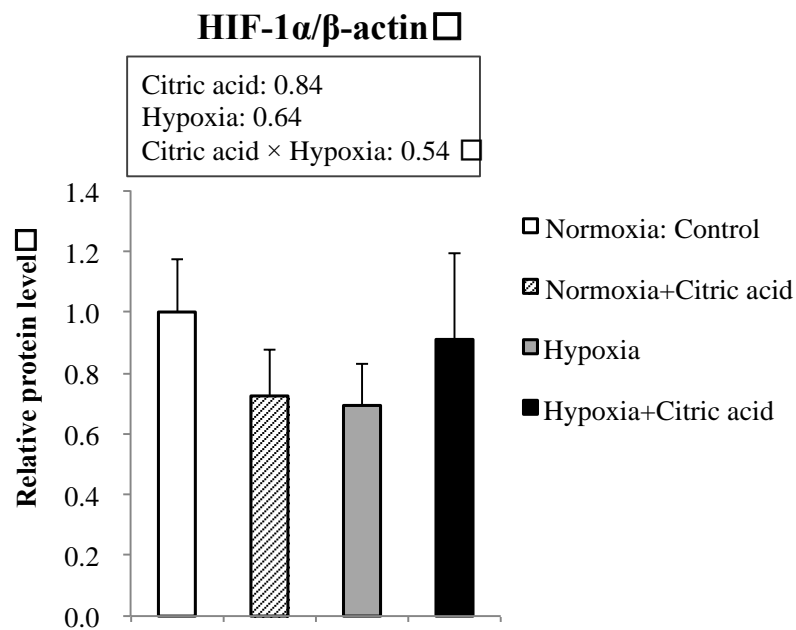


Fig. 2-13 Hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) protein relative expression levels in the soleus muscle

This figure shows relative HIF-1 α protein expression levels in the soleus muscle of rats after hypoxic exposure for 2 hours. Data are means \pm SE (n = 7). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the box.

4. 考察

本章では、ラットの肝臓およびヒラメ筋を用いて低酸素曝露時の糖質代謝の変化に対するクエン酸投与の影響について検討した。

低酸素環境では、glucose transporter 1 (*GLUT1*) の遺伝子発現の上昇により、糖取込みや解糖系が亢進する (McClain et al. 2013; Kelly et al. 2010; Brooks et al. 1991)。本章においても、肝臓の *GLUT1* の遺伝子発現は低酸素曝露により有意に上昇していた。*GLUT1* は赤血球に最も多く発現しているため、肝臓中に残存していた赤血球の *GLUT1* が検出された可能性もある。したがって、脱血処理を行った肝臓での再検討が必要である。また、*GLUT2* の遺伝子発現も低酸素曝露により有意に上昇していた。低酸素曝露による *GLUT2* の遺伝子発現の上昇は、現在のところスズキ類においてのみ報告されていることから (Terova et al. 2009)、本研究における肝臓の *GLUT2* の遺伝子発現の上昇は、哺乳類において初めての報告である。したがって、本研究の低酸素条件下でも糖取込みが亢進する可能性が示された。

低酸素曝露により、解糖系の律速酵素である hexokinase (*Hk*)、phosphofructokinase (*Pfk*)、pyruvate kinase (*Pk*) の遺伝子発現が上昇することが細胞を用いた研究にて報告されている (Semenza 2012)。解糖系の亢進は、低酸素曝露時に減少するミトコンドリア内の TCA 回路や β -酸化、電子伝達系による ATP 産生を補うための重要な反応である。本章においても、低酸素曝露により肝臓の *Gck* および *Pfkl* の遺伝子発現は有意に上昇し、低酸素曝露により解糖系が亢進する可能性が示された。一方で、本研究の低酸素条件では肝臓の *Pklr* の遺伝子発現は変化せず、ラットと細胞では異なる低酸素応答を示すことが明らかになった。

低酸素曝露時の糖取込みや解糖系に関わる酵素の遺伝子発現の変化は、低酸素誘導因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) により制御されている。また、HIF-1 α は糖取込みや解糖系を亢進すると同時に、ミトコンドリア内での酸化的リン酸化を抑制することも報告されている (Majmundar et al. 2010)。これらの報告から、本章でみられた低酸素曝露による *GLUT1*、*GLUT2* および *Gck*、*Pfkl* の遺伝子発現の上昇は、HIF-1 α の安定化に起因するものと推察された。そこで、ウェスタンブロット法により肝臓の HIF- α タンパク質を測定したが、検出されなかった。HIF-1 α のタンパク質の安定化に関する *in vivo* での検討は少ないものの、HIF-1 α のタンパク質発現について様々な臓器で検討した報告では、酸素濃度 10% で 2 週間飼育したラットの、脳、筋肉、腎皮

質では HIF-1 α が検出されたが、肝臓と心臓では検出されなかった (Bianciardi et al. 2006)。また、Stroka らは、酸素濃度 6% で 1 時間低酸素曝露したマウスの肝臓では HIF-1 α タンパク質が検出されるが、酸素濃度 9%、1 時間の低酸素曝露では検出されないと報告しており (Stroka et al. 2001)、本研究と同様の結果であった。

低酸素曝露時には糖の利用が亢進し低血糖となることが懸念されるが、この低血糖を防ぐためには肝臓でのグリコーゲン分解と糖新生が重要な役割を果たしていることが報告されている (Lewis et al. 1942)。酸素濃度 5% で 30 分間低酸素曝露したラットの肝臓グリコーゲン量が約 47% 減少したという報告や、3800m で 30 日間飼育したマウスの肝臓グリコーゲン量が約 50% 減少したとの報告もある (Freminet 1981; Blume and Pace 1967)。本章では、低酸素曝露により血糖値は低下しなかった。この時、低酸素群の肝臓グリコーゲン量は、常酸素群と比較して有意差はみられなかったものの約 37% 減少していた ($P = 0.13$)。さらに、糖新生の律速酵素である phosphoenolpyruvate carboxykinase1 (*Pck1*) の遺伝子発現は低酸素曝露により有意に上昇していたことから、肝臓グリコーゲンの分解と糖新生により低血糖が抑制されたと推察される。

上述のように、本章では糖新生の律速酵素である *Pck1* の遺伝子発現は低酸素曝露により有意に上昇しており、低酸素曝露は解糖系と同時に糖新生を亢進させることが示された。この時、低酸素曝露群の血中乳酸値は、常酸素群と比較して有意に低値を示していた。従来、低酸素曝露時には血中の乳酸が上昇するとされてきた。一方で、肝臓のプロリン水酸化酵素 (prolyl hydroxylase, PHD) をノックアウトした低酸素応答活性化マウスでは、コリ回路の活性化により肝臓への乳酸の取込みが亢進し、血中乳酸値が低下すると報告されている (Suhara et al. 2015)。したがって、本章での低酸素曝露による血中乳酸値の低下は、乳酸が糖新生の基質として利用されたことによると考えられる。

PHD の不活性化により *Pck1* が上昇することは報告されているが (Suhara et al. 2015)、HIF-1 α の安定化が *Pck1* を上昇させることは報告されていないことから、HIF-1 α の安定化のみでは *Pck1* が上昇したメカニズムを説明することはできない。一方、Lewis らは、低酸素曝露直後には急激に血糖が上昇するが、この反応は副腎皮質による調節であると述べている (Lewis et al. 1942)。したがって、本研究の低酸素曝露による糖新生の亢進は、HIF-1 α の安定化による影響だけでなく低酸素曝露によるアドレナリン分泌亢進の影響である可能性も考えられる。

また、本章では、低酸素曝露したラットの糖質代謝の変化に対するクエン酸投与の影響

響についても検討した。第 1 章ではクエン酸投与により血糖値が有意に上昇していたが、本章ではクエン酸投与による血糖値の上昇はみられなかった。この結果は、第 1 章ではクエン酸溶液投与後 30 分で採血したのに対し、本章では低酸素曝露を実施したため、クエン酸溶液投与後 2 時間半での採血だったことが原因であると推察される。肝臓の解糖系の遺伝子発現においては、クエン酸投与による有意な変化はみられなかった。一方で、*GLUT1* の遺伝子発現は、低酸素曝露とクエン酸投与による交互作用が有意であり、クエン酸投与が低酸素曝露による糖取込みの上昇をさらに高めている可能性が示された。

糖新生においては、クエン酸投与による肝臓の *Pck1* および *G6pc* の遺伝子発現の有意な変化はみられず、第 1 章 第 2 節の結果と一致していた。

本章では、ヒラメ筋でも低酸素曝露による糖質代謝の変化とそれに対するクエン酸投与の影響を遺伝子発現レベルで検討した。肝臓では、低酸素曝露およびクエン酸投与により様々な糖質代謝関連遺伝子が増加したが、ヒラメ筋では低酸素曝露により *Pck1* が有意に上昇したのみで、その他の遺伝子発現に影響はみられなかった。また、*HIF-1 α* のタンパク質発現も上昇しておらず、本章の条件下では骨格筋は低酸素曝露の影響を殆ど受けていなかった可能性が考えられる。一方で、糖新生の律速酵素である *Pck1* の遺伝子発現は低酸素曝露により有意に上昇しており、肝臓での結果と同様であった。糖新生は主に肝臓と腎臓で進行する。骨格筋であるヒラメ筋では糖新生は起こらないが、骨格筋の *Pck* はピルビン酸を供給するための重要な役割を持つことが明らかにされている (Yang et al. 2009)。さらに、骨格筋の *Pck* が高発現したマウスでは、ミトコンドリアが増加し持久力が高まると報告されている (Hakimi et al. 2007)。低酸素曝露によるヒラメ筋での *Pck1* の遺伝子発現の上昇は、糖新生の基質としてのピルビン酸の供給を増加させることにより低酸素下での血糖値の低下を抑制し、また、ミトコンドリアを増加させることにより低酸素下でのエネルギー産生の低下を抑制すると考えられ、低酸素への適応反応の 1 つであると推察される。第 1 章においては、クエン酸投与により骨格筋の *Pck1* の遺伝子発現が約 11.1 倍に上昇していたが、本章ではクエン酸投与による *Pck1* の遺伝子発現の上昇は約 1.7 倍であった。これは、第 1 章ではクエン酸投与 30 分後に肝臓を摘出したのに対し、本章はクエン酸投与 2 時間半後に摘出したためであると考えられる。

低酸素曝露によって、骨格筋の糖質代謝関連遺伝子発現に変化がみられなかった理由

としては、骨格筋はエネルギー代謝を変化させることにより低酸素に適応するのではなく、活動量を抑えることにより低酸素に適応していたことが考えられる。実際、低酸素曝露したラットは、酸素濃度 15.0%を下回る頃から活動がみられなくなり、酸素濃度 10.5%では身体が伸びきった腹臥位となった。一方で、肝臓のような生命維持に必須の臓器では、低酸素に適応するために糖質代謝を変化させたと推察される。

本章では、ラットへの低酸素曝露は、肝臓での解糖系と糖新生を同時に亢進させる可能性が遺伝子発現レベルで示された。一方で、クエン酸の投与は、低酸素曝露により上昇した *GLUT1* の遺伝子発現をさらに上昇させたのみで、他の遺伝子発現には影響はみられなかった。

5. 小括

本章では、ラットの肝臓およびヒラメ筋を用いて低酸素曝露時の糖質代謝の変化に対するクエン酸投与の影響について検討した。

肝臓での検討では、低酸素曝露により *GLUT1*、*GLUT2*、および、*Gck*、*Pfk1* の遺伝子発現が有意に上昇し、低酸素曝露により糖取込みと解糖系が亢進する可能性が示された。さらに、低酸素曝露により糖新生の律速酵素である *Pck1* の遺伝子発現が有意に上昇しており、低酸素曝露は糖新生も亢進させることが示された。また、低酸素曝露により血中乳酸値が有意に低値を示しており、乳酸が糖新生の基質として利用された可能性が示された。低酸素曝露に対するクエン酸投与の影響については、クエン酸投与が低酸素曝露による *GLUT1* の上昇をさらに高めたが、その他の影響はみられなかった。

ヒラメ筋での検討では、低酸素曝露により *Pck1* が有意に上昇したのみで、クエン酸投与の影響はみられず、本章の条件下ではヒラメ筋は肝臓と比較して低酸素曝露の影響を受けないことが示された。

以上より、本章では、ラットへの低酸素曝露は、肝臓での糖取込みおよび解糖系と糖新生を同時に亢進させる可能性が遺伝子発現レベルで示された。一方で、クエン酸投与は低酸素曝露により上昇した *GLUT1* の遺伝子発現をさらに上昇させたのみで、低酸素曝露に対するクエン酸投与の明確な有効性を示すことはできなかった。

第3章 低酸素曝露およびクエン酸投与が TCA 回路内代謝物と糖原性アミノ酸に及ぼす影響

1. 緒言

第1章ではクエン酸の疲労軽減メカニズムを探ることを目的とし、マウスの肝臓と骨格筋を用いて遺伝子発現量の変化を網羅的に解析した。その結果、ミトコンドリア内の遺伝子発現量に大きな変化はみられず、投与したクエン酸がミトコンドリア内に直接供給されて ATP 産生を亢進する可能性は低いことが示された。一方で、クエン酸投与により糖新生が亢進することが示唆された。第2章では、低酸素曝露により、糖取込み、解糖系、糖新生が同時に亢進することが遺伝子発現レベルで示された。クエン酸投与は低酸素曝露により上昇した *GLUT1* の遺伝子発現をさらに上昇させたのみで、他の遺伝子発現には影響を与えなかった。

第3章では、第1章および第2章において遺伝子発現レベルで得られた結果を代謝物レベルで検証することを目的とし、低酸素曝露およびクエン酸投与が、(1) TCA 回路内の代謝物、(2) 糖原性アミノ酸に与える影響をラットの血漿を用いて LC-MS/MS 分析により検討した。

2. 方法

2.1 実験動物とプロトコール

8週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットを購入し、第2章と同様の条件で飼育した。各群の体重が等しくなるように常酸素群 (Normoxia: Control)、クエン酸投与群 (Normoxia+Citric acid)、低酸素群 (Hypoxia)、低酸素+クエン酸投与群 (Hypoxia+Citric acid) の4群に分けた ($n = 8$)。酸素濃度は、第2章と同様に、常酸素群 21.0%、低酸素群 10.5%とした。クエン酸濃度も第2章と同様、ラットの体重 300 g あたり 200 mg/3 mL とした。曝露開始 30 分前に蒸留水またはクエン酸溶液をゾルデにて胃内投与し、2 時間低酸素曝露した。解剖時には血液、肝臓、ヒラメ筋を摘出した。採血には EDTA 採血管を用いた。血液は直ちに遠心分離 ($1,900 \times g$, 10 分) し、血漿を得た。血漿は liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS/MS 分析まで -80°C で冷凍保存した。肝臓およびヒラメ筋は分析まで -30°C で冷凍保存した。

本研究は、昭和女子大学実験動物倫理委員会の承認を得た後 (承認番号: 15-12)、動物実験倫理規定に従い実施した。

2.2 LC-MS/MS による TCA 回路内代謝物と糖原性アミノ酸の血漿中濃度の分析

2.2.1 サンプル調製

血漿 50 μL に、メタノール 450 μL 、クロロホルム 500 μL 、Milli-Q 水を 200 μL 加えた後 (各溶液を添加することによく混合した)、遠心分離した ($14,000 \times g$, 10 分, 4°C)。この上清 450 μL に Milli-Q 水 200 μL を加えて混合し、遠心分離した ($14,000 \times g$, 10 分, 4°C)。この遠心操作後の作業は全て氷上で行った。上清 550 μL をアミコンウルトラ 3k (Merck Millipore Inc.) に移し、遠心ろ過した ($12,000 \times g$, 60 分, 4°C) 後、遠心濃縮機の High モードで 70 分間遠心濃縮した。サンプルは LC-MS/MS 測定まで -80°C で保存した。サンプルは分析当日に Milli-Q 水 25 μL に溶解し、溶解したサンプル 15 μL に Milli-Q 水を 15 μL 加え、LC-MS/MS に供した。

2.2.2 LC-MS/MS 装置および測定条件

血漿中の代謝物は、検出には超高速液体クロマトグラフ Nexera UHPLC/HPLC System (島津 (株)) を、定量には QTRAP®4500 システム (AB Sciex) を用い、両極性モード (positive/negative ion mode) で測定した。カラムは、positive の測定には、

Intrada Amino Acid (100 mm × 2 mm) (インタクト (株))、negative の測定には、Scherso SM-C18 (50 mm × 2 mm) (インタクト (株)) を使用した。LC-MS/MS の測定条件は、Table 1 に示した。

Table 1. The conditions of LC-MS for analysis of plasma

LC Conditions			MS Conditions		
Mode	Intrada Amino Acid (Positive)	Scherzo SM-C18 (Negative)	Mode	Intrada Amino Acid (Positive)	Scherzo SM-C18 (Negative)
Injection volume	0.2, 5 µL	0.25, 5 µL	Multiple reaction monitoring, MRM		
Flow rate (mL/min)	0.3	0.25	MRM windows	90 sec	90 sec
Column temperature	40°C	40°C	Target scan time	0.5 sec	0.5 sec
Cooler	4°C	4°C	Temperature	400°C	400°C

Mobile phase of positive ion mode

Time/min	A, %	B, %
3.3	20	80
11.7	100	0
15	100	0
15.1	20	80
17.5	20	80
17.6	STOP	

A = 1 M ammonium formate : Milli-Q water : acetonitrile = 40 : 360 : 100

B = Acetonitrile : formate = 500 : 1.5

Mobile phase of negative ion mode

Time/min	A, %	B, %
0	100	0
7	85	15
10	50	50
16.9	50	50
17	100	0
20	100	0
20.1	STOP	

A = Milli-Q water: formate = 500 : 1.5

B = Acetonitrile : formate = 500 : 10

2.2.3 データ解析

LC-MS/MS により得られたデータは、MultiQuant 2.11 (AB Sciex) を用いてピーク面積を算出し、内部標準による補正を行ったピーク強度、面積を用いて血漿代謝物を定量した。

2.3 肝臓およびヒラメ筋中の ATP 抽出および測定

肝臓およびヒラメ筋中の ATP の抽出および測定には、動物組織用 ATP 抽出・測定システム『組織の』ATP 測定キット (東洋ビーネット (株)) を用いた。発光量の測定は、コンパクトルミノメーターGene Light GL-220 (マイクロテック・ニチオン (株)) で行った。

2.4 統計

データは全て平均値±標準誤差で示した。クエン酸および低酸素曝露の効果について、クエン酸投与と低酸素曝露の交互作用を因子とする二元配置分散分析を実施した。また、二元配置分散分析の結果、交互作用が有意であった場合には **Tukey** の多重比較検定を実施した。 $P < 0.05$ の時、有意差ありとした。

3. 結果

3.1 LC-MS/MS による TCA 回路内代謝物と糖原性アミノ酸の血漿中濃度の分析

3.1.1 TCA 回路内の代謝物と乳酸

TCA 回路内代謝物および乳酸の血漿中濃度を Fig. 3-1 に示した。二元配置分散分析の結果、交互作用は有意ではなくクエン酸投与の主効果が有意であった代謝物は、クエン酸、シスアコニット酸、イソクエン酸、 α -ケトグルタル酸、フマル酸、リンゴ酸で、クエン酸投与により上昇していた。低酸素曝露の主効果が有意であった代謝物は、クエン酸であり、低酸素曝露により有意に上昇していた。コハク酸は、二元配置分散分析の結果、交互作用が有意であり、Tukey の多重比較検定の結果、低酸素群で常酸素群およびクエン酸投与群よりも有意に低値を示した。一方で、低酸素+クエン酸投与群と他の 3 群間に有意な差はみられなかった。乳酸は、交互作用は有意ではなく、クエン酸投与および低酸素曝露の主効果もみられなかった。

3.1.2 ピルビン酸とオキサロ酢酸を介する糖原性アミノ酸

ピルビン酸に代謝されオキサロ酢酸を経て糖新生経路に入るアミノ酸と、直接オキサロ酢酸に代謝され糖新生経路に入るアミノ酸の血漿中濃度を Fig. 3-2 に示した。二元配置分散分析の結果、交互作用が有意であったのは、グリシン、トリプトファンであった。Tukey の多重比較検定の結果、グリシンはクエン酸投与により有意に上昇していた。トリプトファンは低酸素曝露により有意に上昇していた。セリンは、交互作用は有意ではなくクエン酸の主効果が有意であり、クエン酸投与により上昇していた。ヒドロキシプロリン、スレオニン、アスパラギン酸には、交互作用および主効果は認められなかった。

3.1.3 α -ケトグルタル酸を介する糖原性アミノ酸

α -ケトグルタル酸に代謝され糖新生経路に入るアミノ酸の血漿中濃度を Fig. 3-3 に示した。二元配置分散分析の結果、交互作用が有意であった代謝物は、ヒスチジンとアルギニンであった。Tukey の多重比較検定の結果、ヒスチジンは、クエン酸投与、低酸素曝露、およびその組み合わせにより有意に上昇していた。アルギニンはクエン酸投与群が他の 3 群よりも有意に高値を示した。交互作用は有意ではなくクエン酸投与の主効果が有意であった代謝物はグルタミンで、クエン酸投与により上昇していた。交互作用が有意ではなく低酸素曝露の主効果が有意であった代謝物はプロリンで、低酸素曝露によ

り低下していた。

3.1.4 サクシニル-CoA とフマル酸を介する糖原性アミノ酸

サクシニル-CoA に代謝され糖新生経路に入るアミノ酸、フマル酸に代謝され糖新生経路に入るアミノ酸の血漿中濃度を Fig. 3-4 に示した。二元配置分散分析の結果、交互作用が有意であった代謝物はメチオニンのみであった。Tukey の多重比較検定の結果、メチオニンは、クエン酸投与、低酸素曝露、およびその組み合わせにより有意に上昇していた。交互作用は有意ではなくクエン酸投与の主効果が有意であった代謝物は、イソロイシン、フェニルアラニンで、クエン酸投与により上昇していた。交互作用が有意ではなく低酸素曝露の主効果が有意であった代謝物は、イソロイシン、バリン、フェニルアラニンで、低酸素曝露により上昇していた。チロシンは、交互作用および主効果は認められなかった。

3.2 肝臓およびヒラメ筋中の相対 ATP 量

肝臓およびヒラメ筋中の相対 ATP 量を Fig. 3-5 に示した。二元配置分散分析の結果、肝臓およびヒラメ筋中の相対 ATP 量において、クエン酸投与と低酸素曝露の交互作用は認められなかった。肝臓中の相対 ATP 量はクエン酸の主効果が有意で、クエン酸投与により減少していた。

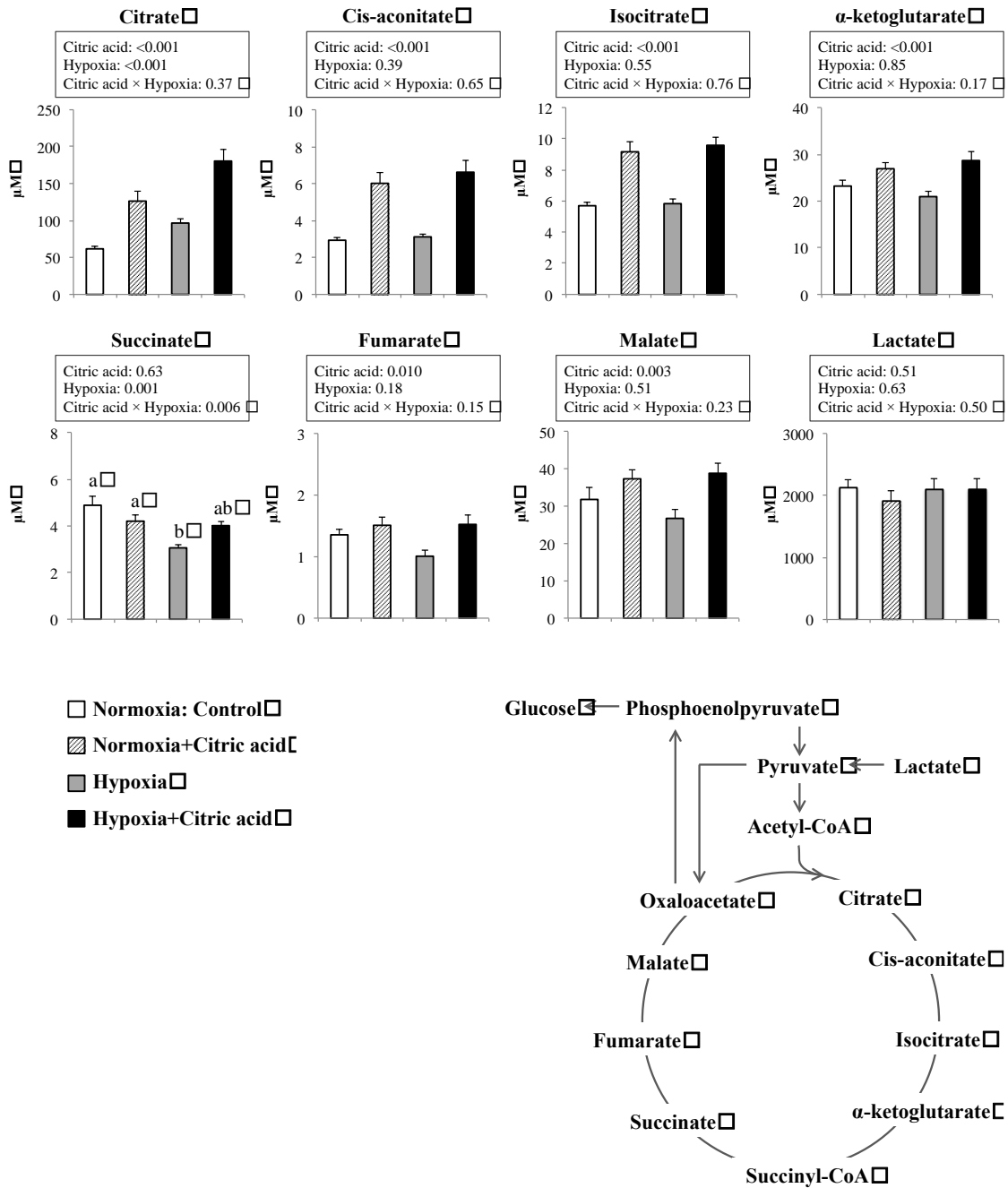


Fig. 3-1 The concentrations of tricarboxylic acid (TCA) cycle metabolites and lactate in plasma

This figure shows the concentrations of TCA cycle metabolites and lactate in plasma of rats after hypoxic exposure for 2 hours. Data are means ± SE (n = 8). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the boxes. Means without a common letter are significantly different by Tukey's test (P < 0.05).

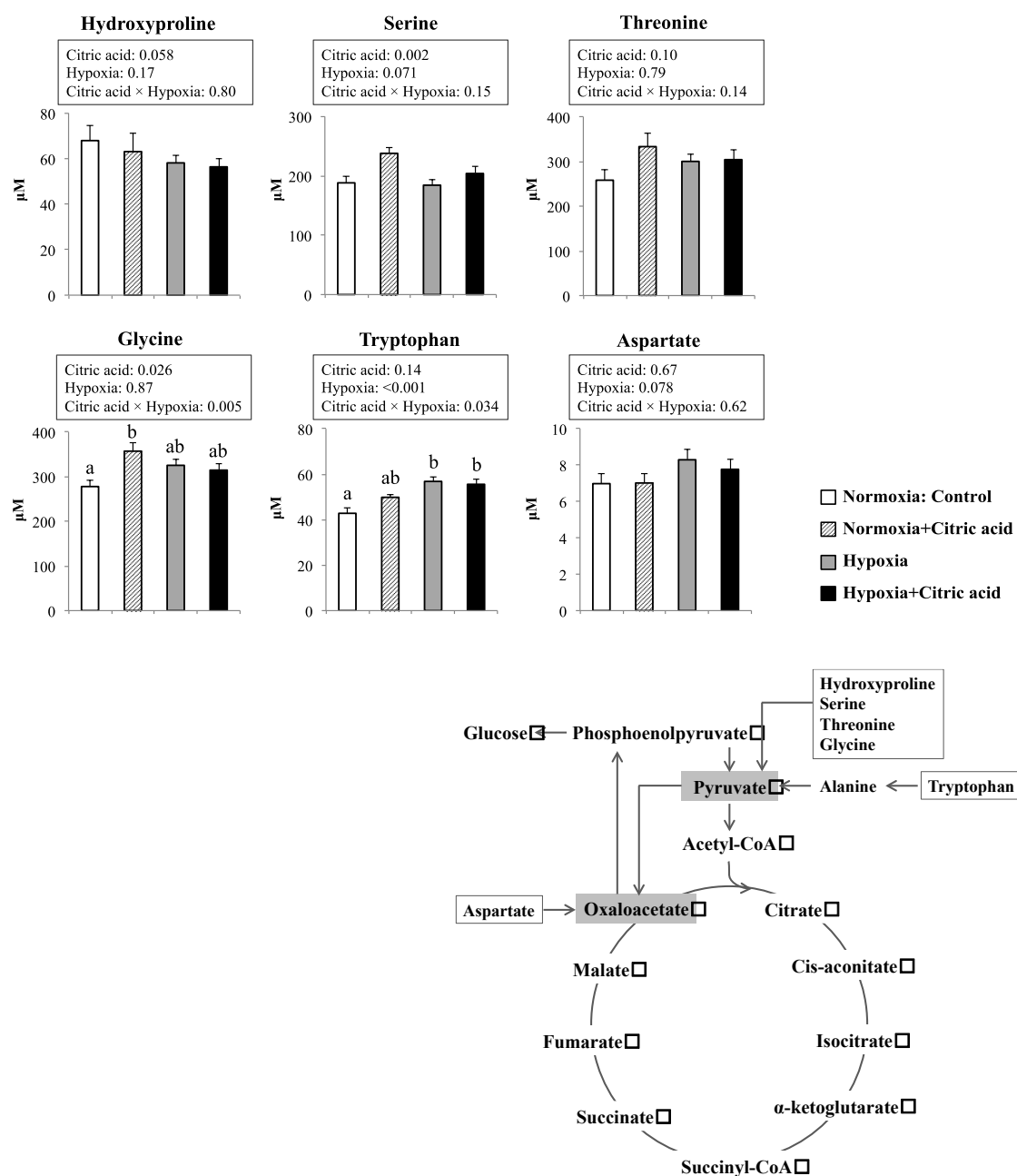


Fig. 3-2 The concentrations of glycoenic amino acids in plasma

This figure shows the concentrations of glycoenic amino acids including hydroxyproline, serine, threonine, glycine, tryptophan, and aspartate in plasma of rats after hypoxic exposure for 2 hours. Data are means ± SE (n = 8). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the boxes. Means without a common letter are significantly different by Tukey's test (P < 0.05).

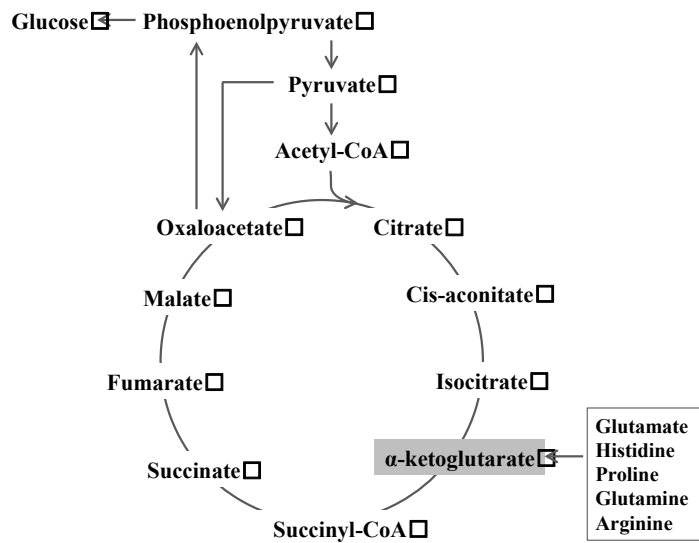
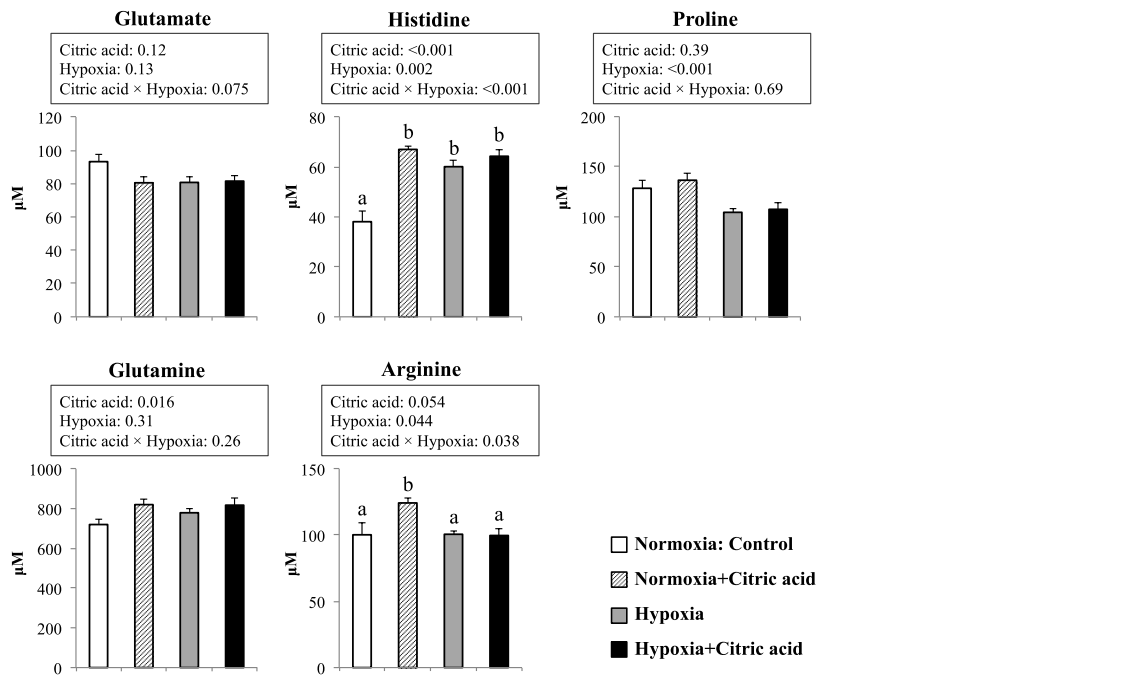


Fig. 3-3 The concentrations of glycogenic amino acids in plasma

This figure shows the concentrations of glycogenic amino acids including glutamate, histidine, proline, glutamine, and arginine in plasma of rats after hypoxic exposure for 2 hours. Data are means ± SE (n = 8). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the boxes. Means without a common letter are significantly different by Tukey's test (P < 0.05).

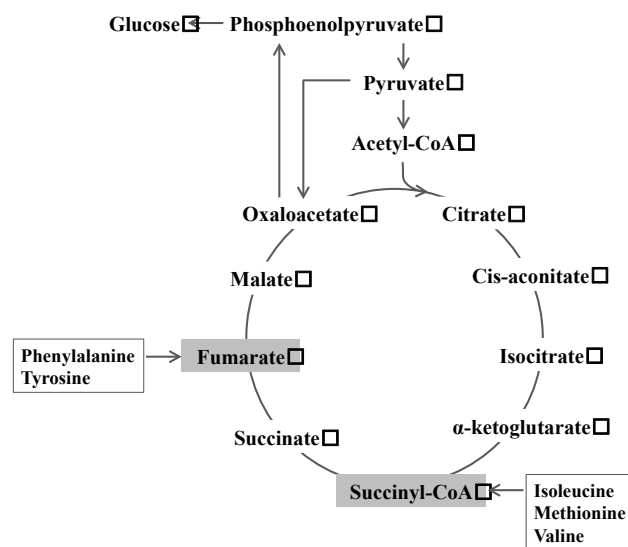
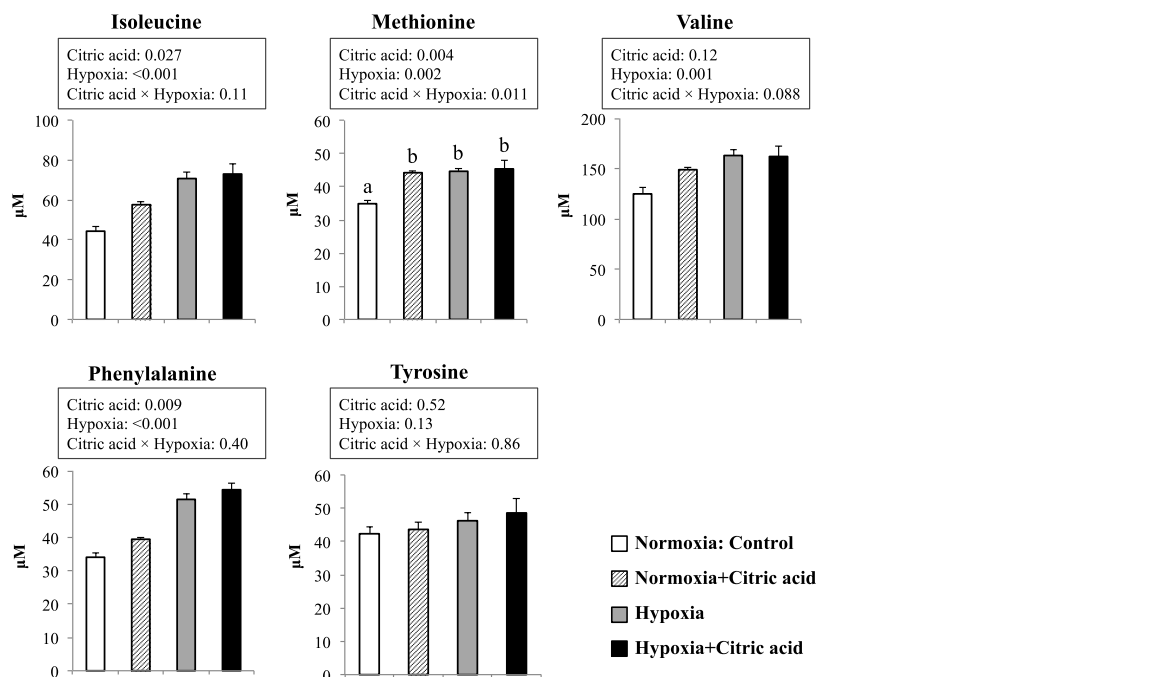


Fig. 3-4 The concentrations of glycogenic amino acids in plasma

This figure shows the concentrations of glycogenic amino acids including isoleucine, methionine, valine, phenylalanine, and tyrosine in plasma of rats after hypoxic exposure for 2 hours. Data are means \pm SE (n = 8). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the boxes. Means without a common letter are significantly different by Tukey's test (P < 0.05).

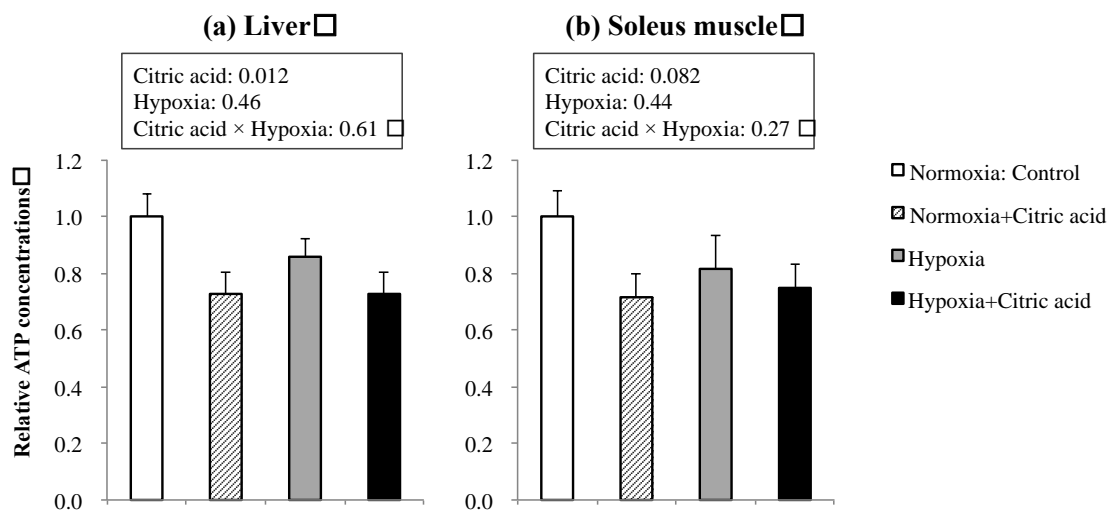


Fig. 3-5 The relative ATP concentrations in the liver and soleus muscle

This figure shows the relative ATP concentrations in the liver and soleus muscle of rats after hypoxic exposure for 2 hours. RLU detected by the device for known concentrations of pure ATP. Data are means \pm SE (n = 8). Statistical significance determined by two-way ANOVA is shown in the boxes.

4. 考察

本章では、低酸素曝露およびクエン酸投与が (1) TCA 回路内の代謝物に与える影響、(2) 糖原性アミノ酸に与える影響について、ラット血漿の LC-MS/MS 分析により検討した。

クエン酸投与により、TCA 回路内の代謝物であるクエン酸、シスアコニット酸、イソクエン酸、 α -ケトグルタル酸、フマル酸、リンゴ酸の血漿中濃度が有意に上昇しており、クエン酸投与は TCA 回路内の代謝物を増加させることが示された。第 1 章の肝臓および骨格筋を用いた遺伝子発現解析では、クエン酸投与は TCA 回路内の酵素の遺伝子発現を変化させなかった。一方で、本章での血漿代謝物の検討では、TCA 回路内のコハク酸を除く全ての代謝物がクエン酸投与により有意に上昇していたことから、クエン酸は直接、もしくは間接的に TCA 回路に影響を与えることが示された。クエン酸は、クエン酸輸送体によりミトコンドリアから細胞質に輸送されるが、細胞質からミトコンドリアへの輸送体は発見されていない。したがって、クエン酸が直接ミトコンドリアに、すなわち TCA 回路内に供給されたとは考えにくい。

糖原性アミノ酸に着目すると、本研究では、ピルビン酸に代謝されるセリンとグリシンがクエン酸投与により有意に上昇していた。したがって、クエン酸投与による TCA 回路の代謝物の上昇は、セリンとグリシンの上昇に伴いピルビン酸が上昇し、このピルビン酸がミトコンドリア内に供給された可能性も考えられる。さらに本章では、クエン酸投与により、 α -ケトグルタル酸に代謝されるヒスチジンとアルギニン、サクシニル-CoA に代謝されるイソロイシンとメチオニン、フマル酸に代謝されるフェニルアラニンが有意に上昇しており、これらの糖原性アミノ酸が TCA 回路内代謝物を増加させた可能性もある。現在のところ、クエン酸投与による TCA 回路内代謝物の変動に関する報告はみられず、本章で明らかになったクエン酸投与による TCA 回路内代謝物の増加は、初めての報告である。

肝臓の ATP 量は、クエン酸投与により有意に減少した。この結果は、第 1 章 第 2 節の肝臓を用いた検討にて、クエン酸投与がミトコンドリア内膜の ATP 産生関連遺伝子発現を減少させたという結果と一致していた。したがって、クエン酸投与は TCA 回路内の代謝物を上昇させるが、ATP 産生を増加させる可能性は低いことが示された。

本章では、低酸素曝露により、TCA 回路内の代謝物であるクエン酸が有意に上昇しコハク酸が有意に低下した。また、糖新生の基質となり得る糖原性アミノ酸は、低酸素

曝露により、トリプトファン、ヒスチジン、イソロイシン、メチオニン、バリン、フェニルアラニンが有意に上昇していた。第2章では、肝臓およびヒラメ筋において低酸素曝露により糖新生が亢進する可能性が遺伝子発現レベルで示されたことから、本章での低酸素曝露による糖原性アミノ酸の上昇は、これらのアミノ酸が低酸素曝露時に糖新生の基質となる可能性を示している。

一方で、低酸素曝露による糖原性アミノ酸の上昇は、HIF-1 α の安定化に寄与していた可能性もある。イソロイシン、メチオニン、バリンはサクシニル-CoAを経てコハク酸へと代謝され、フェニルアラニンはフマル酸へと代謝される。コハク酸とフマル酸はprolyl hydroxylase (PHD)を阻害することによりHIF-1 α の安定化に寄与することが明らかにされている(Majmundar et al. 2010; Hewitson et al. 2007)。本章での低酸素曝露によるコハク酸の有意な減少は、HIF-1 α の安定化のためにコハク酸が消費されたことに起因すると考えられ、低酸素曝露による糖原性アミノ酸(イソロイシン、メチオニン、バリン、フェニルアラニン)の上昇は、低下したコハク酸を補い、HIF-1 α の安定化を促進するためであると推察される。

また、低酸素曝露時には解糖系が亢進する一方で、ミトコンドリア内でのエネルギー産生は抑制されることが知られており(McClain et al. 2013; Brooks et al. 1991; Katsumata et al. 1984)、実際に肝臓や心臓のATPが減少することもラットを用いた検討にて報告されている(Ni et al. 2015; Freminet 1981)。しかし、本研究の条件では肝臓およびヒラメ筋のATP量には低酸素曝露による有意な差はみられなかった。Niらは、ラットに4300 m(酸素濃度12.5%相当)で1日の低酸素曝露をすると肝臓のATP量が減少すること、Freminetは、ラットに酸素濃度5%で30分間の低酸素曝露をすると心臓のATP量が減少することを報告していることから、本研究の条件である酸素濃度10%、2時間の低酸素曝露は、低酸素曝露による臓器のATP量の減少を誘発するには不十分であったと推察される。

第2章では、低酸素曝露したラットの解糖系や糖新生に関わる遺伝子発現が上昇したが、クエン酸投与と低酸素曝露の交互作用はGLUT1以外にみられなかった。

代謝物を測定した本章においても、クエン酸投与と低酸素曝露との交互作用はほとんどみられず、クエン酸が低酸素に対して有効な食品成分となり得る可能性を示すことはできなかった。しかし、最近、慢性疲労症候群の患者やその疾患モデルであるラットを用いた代謝物解析が実施されており、いずれにおいてもTCA回路の初期段階の代謝物(ク

エン酸、シスアコニット酸、イソクエン酸) が減少することが報告されている (Yamano et al. 2016; Kume et al. 2015)。本章では、クエン酸投与により TCA 回路内のコハク酸以外の全ての代謝物が有意に上昇していた。常酸素群 (コントロール) に対するクエン酸投与群の TCA 回路内代謝物の増加比率は、クエン酸 2.05 倍、シスアコニット酸 2.05 倍、イソクエン酸 1.61 倍、 α -ケトグルタル酸 1.16 倍、フマル酸 1.11 倍、リンゴ酸 1.17 倍で、TCA 回路の初期段階の代謝物が特に増加していた。本章では低酸素曝露に対するクエン酸投与の直接的な有効性を示すことはできなかったが、クエン酸投与は疲労により減少する TCA 回路内の代謝物を増加させたことから、クエン酸が COPD 患者の疲労軽減に対して有効である可能性が示された。

以上より、本章では、クエン酸投与は、疲労により減少する TCA 回路内代謝物を増加させることで、疲労軽減に有効である可能性が示された。また、低酸素曝露は糖原性アミノ酸を上昇させ、糖新生の基質として利用されるだけでなく、HIF-1 α の安定化に寄与する可能性が示された。

5. 小括

本章では、第 1 章および第 2 章において遺伝子発現レベルで得られた結果を代謝物レベルで検証することを目的として、低酸素曝露およびクエン酸投与が TCA 回路内の代謝物と糖原性アミノ酸に与える影響について、ラット血漿の LC-MS/MS 分析により検討した。

その結果、クエン酸投与は TCA 回路内の代謝物、特に初期代謝物を上昇させ、クエン酸が直接、もしくは間接的に TCA 回路に影響を与えることが示された。このクエン酸投与による TCA 回路内の代謝物の上昇は、セリンとグリシンの上昇に伴うピルビン酸の上昇と、ヒスチジン、アルギニン、イソロイシン、メチオニンの血漿濃度の上昇によるものであると推察された。また、肝臓の ATP 量はクエン酸投与により有意に減少しており、クエン酸投与は TCA 回路の代謝物を上昇させるが、ATP 産生を亢進させる可能性は低いことが示された。

低酸素曝露は、TCA 回路内の代謝物であるクエン酸の有意な上昇、コハク酸の有意な低下を引き起こしたが、それ以外の代謝物には有意な差はみられず、TCA 回路内の代謝物にほとんど影響を与えなかった。また、低酸素曝露は糖原性アミノ酸である、ヒスチジン、イソロイシン、メチオニン、バリン、フェニルアラニンの血漿濃度を有意に上昇させた。イソロイシン、メチオニン、バリンはサクシニル-CoA を経てコハク酸へと代謝され、フェニルアラニンはフマル酸へと代謝される。また、コハク酸とフマル酸は HIF-1 α の安定化に寄与する。したがって、低酸素曝露により上昇したこれらの糖原性アミノ酸が、糖新生の基質として利用される可能性と、HIF-1 α の安定化に寄与する可能性が示された。

本章での代謝物の測定において、クエン酸投与が低酸素に対して直接的に有効である可能性を示すことはできなかった。一方で、疲労時には TCA 回路の初期段階の代謝物が減少するが、クエン酸投与は TCA 回路内の初期代謝物を増加させたことから、クエン酸は COPD 患者の疲労感に対しては有効である可能性が示された。

総括

COPD 患者では気流閉塞による低酸素状態により疲労感が生じ、身体活動性が低下する。低酸素条件下では、糖利用の亢進や炎症が誘導されると報告されており、これらが COPD 患者の疲労感の一因となっていると考えられる。一方、クエン酸には疲労軽減効果があると期待されており、クエン酸は COPD 患者の疲労感に対して有効な食品成分となり得る可能性がある。そこで本研究では、COPD の食事療法を確立するための基礎的知見を得ることを目的とし、低酸素曝露が糖質代謝に与える影響とクエン酸投与の有効性についてラットを用いて検討した。

第 1 章では、クエン酸の疲労軽減メカニズムを明らかにすることを目的とし、クエン酸投与が糖質代謝と炎症関連遺伝子発現に与える影響を、マウスの骨格筋と肝臓を用いて網羅的に解析した。第 1 節の骨格筋を用いた試験では、クエン酸投与による疲労軽減効果は TCA 回路や電子伝達系の活性化によるものではなく、糖新生の亢進と炎症の抑制によるものである可能性が遺伝子発現レベルで示された。第 2 節の肝臓を用いた試験においても骨格筋での試験と同様に、クエン酸の投与は TCA 回路や電子伝達系の遺伝子発現を増加させなかったが、第 1 節と同様に糖新生を亢進する可能性が示された。以上より、クエン酸投与は糖新生を亢進させ炎症を抑制することにより、COPD 患者の疲労感の軽減に寄与する可能性が示された。

第 2 章では、低酸素曝露の影響と低酸素曝露に対するクエン酸投与の有効性について、ラットの肝臓とヒラメ筋を用いて遺伝子発現レベルで明らかにすることを目的とした。第 1 章で明らかにされたクエン酸投与による糖新生亢進効果と炎症抑制効果のうちの糖新生に着目し、糖質代謝関連遺伝子発現について検討した。肝臓では、低酸素曝露は糖取込み、解糖系、糖新生を同時に亢進する可能性が示された。また、低酸素曝露により血中乳酸値が有意に低値を示したことから、乳酸が糖新生の基質として利用された可能性が示された。低酸素曝露に対するクエン酸投与の影響については、クエン酸投与により低酸素曝露による *GLUT1* の上昇がさらに高められたが、その他の影響は殆どみられなかった。ヒラメ筋では、低酸素曝露により *Pck1* が有意に上昇したのみで、糖取込みや解糖系には影響がみられなかった。また、クエン酸投与も遺伝子発現を変化させなかった。本章の条件下では、ヒラメ筋は肝臓と比較して低酸素曝露の影響をあまり受けないことが示された。

第3章では、第1章および第2章において遺伝子発現レベルで得られた結果を代謝物レベルで検証することを目的として、低酸素曝露およびクエン酸投与がTCA回路内の代謝物と糖原性アミノ酸の血漿中濃度に及ぼす影響について、ラットを用いて検討した。その結果、クエン酸投与はTCA回路内の代謝物の血漿濃度を上昇させたが、この上昇は、セリンとグリシンから代謝されたピルビン酸の上昇により導かれたと推察された。また、クエン酸投与によりいくつかの糖原性アミノ酸が上昇しており、1章でみられたクエン酸による糖新生の亢進にはこれらのアミノ酸が関与している可能性も示された。低酸素曝露では、TCA回路内の代謝物であるコハク酸が有意に減少し、クエン酸は有意に増加していたが、それ以外の代謝物には有意な差はみられなかった。また、低酸素曝露はコハク酸やフマル酸に代謝されるいくつかの糖原性アミノ酸を有意に上昇させた。コハク酸とフマル酸はHIF-1 α の安定化に寄与することから、低酸素曝露による糖原性アミノ酸の上昇は、糖新生の基質として利用される可能性だけでなく、HIF-1 α の安定化に寄与する可能性が示された。低酸素曝露に対するクエン酸投与の直接的な有効性については、第3章においても示すことはできなかった。一方で、クエン酸投与は、疲労時に減少するTCA回路の初期段階の代謝物（クエン酸、シスアコニト酸、イソクエン酸）を増加させたことから、クエン酸はCOPD患者の疲労感を軽減する可能性が示された。

本論文では、「低酸素と疲労感」という新しい切り口で、COPDの食事療法を確立するための基礎的知見を得ることを目的として研究を実施した。本研究を通して、クエン酸投与や低酸素曝露が糖質代謝に与える様々な影響を、遺伝子発現レベルと代謝物レベルで明らかにすることができた。これらの基礎的知見を踏まえ、今後、COPDをはじめとする呼吸器疾患の食事療法に関する研究が「低酸素」や「疲労感」といった新しい観点から行われ、多くの患者のQOLやADLの向上に寄与できることを期待したい。

参考文献

Abdel-Salam OM, Sleem AA, Shaffie NM, Protection against carbon tetrachloride-induced liver damage by citric acid, *Cell Biol: Res Ther*, 2015; **4**(1).

Abdel-Salam OM, Youness ER, Mohammed NA, Morsy SM, Omara EA, Sleem AA, Citric acid effects on brain and liver oxidative stress in lipopolysaccharide-treated mice, *J Med Food*, 2014; **17**(5): 588-598.

Antoniou SA, Petrescu E, Stanescu R, Anisie E, Boiculese L, Impact of fatigue in patients with chronic obstructive pulmonary disease: results from an exploratory study, *Ther Adv Respir Dis*, 2016; **10**(1): 26-33.

Bianciardi P, Fantacci M, Caretti A, Ronchi R, Milano G, Morel S, von Segesser L, Corno A, Samaja M, Chronic in vivo hypoxia in various organs: hypoxia-inducible factor-1alpha and apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; **342**(3): 875-880.

Blume FD, Pace N, Effect of translocation to 3,800 m altitude on glycolysis in mice, *J Appl Physiol*, 1967; **23**(1): 75-79.

Brooks GA, Butterfield GE, Wolfe RR, Groves BM, Mazzeo RS, Sutton JR, Wolfel EE, Reeves JT, Increased dependence on blood glucose after acclimatization to 4,300 m, *J Appl Physiol*, 1991; **70**(2): 919-927.

Bryland A, Wieslander A, Carlsson O, Hellmark T, Godaly G, Citrate treatment reduces endothelial death and inflammation under hyperglycaemic conditions, *Diab Vasc Dis Res*, 2012; **9**(1): 42-51.

- Cahan C, Hoekje PL, Goldwasser E, Decker MJ, Strohl KP, Assessing the characteristic between length of hypoxic exposure and serum erythropoietin levels, *Am J Physiol*, 1990; **258**(2): 1016-1021.
- Eltzschig HK, Carmeliet P, Hypoxia and inflammation, *N Engl J Med*, 2011; **364**(7): 656-665.
- Freminet A, Carbohydrate and amino acid metabolism during acute hypoxia in rats: blood and heart metabolites, *Comp Biochem Physiol B*, 1981; **70**(B): 427-433.
- Hakimi P, Yang J, Casadesus G, Massillon D, Tolentino-Silva F, Nye CK, Cabrera ME, Hagen DR, Utter CB, Baghdy Y, Johnson DH, Wilson DL, Kirwan JP, Kalhan SC, Hanson RW, Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism in the mouse, *J Biol Chem*, 2007; **282**(45): 32844-32855.
- Hewitson KS, Liénard BM, McDonough MA, Clifton IJ, Butler D, Soares AS, Oldham NJ, McNeill LA, Schofield CJ, Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates, *J Biol Chem*, 2007; **282**(5): 3293-3301.
- Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, Land SC, Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; **93**(18): 9493-9498.
- Hohjoh H, Fukushima T, Expression profile analysis of microRNA (miRNA) in mouse central nervous system using a new miRNA detection system that examines hybridization signals at every step of washing, *Gene*, 2007; **391**(1-2): 39-44.

- Katsumata Y, Sato K, Yada S, Katsumata K, Yoshino M, The role of hepatic glycogen stores in anaerobic metabolism in rats, *Comp Biochem Physiol C*, 1984; **79**(1): 147-150.
- Kelly KR, Williamson DL, Fealy CE, Kriz DA, Krishnan RK, Huang H, Ahn J, Loomis JL, Kirwan JP, Acute altitude-induced hypoxia suppresses plasma glucose and leptin in healthy humans, *Metabolism*, 2010; **59**(2): 200-205.
- Kume S, Yamato M, Tamura Y, Jin G, Nakano M, Miyashige Y, Eguchi A, Ogata Y, Goda N, Iwai K, Yamano E, Watanabe Y, Soga T, Kataoka Y, Potential biomarkers of fatigue identified by plasma metabolome analysis in rats, *PLoS One*, 2015; **10**(3): e0120106.
- Lewis RA, Thorn GW, Koepf GF, Dorrance SS, The role of the adrenal cortex in acute anoxia, *J Clin Invest*, 1942; **21**(1): 33-46.
- Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC, Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress, *Mol Cell*, 2010; **40**(2): 294-309.
- McClain DA, Abuelgasim KA, Nouraie M, Salomon-Andonie J, Niu X, Miasnikova G, Polyakova LA, Sergueeva A, Okhotin DJ, Cherqaoui R, Okhotin D, Cox JE, Swierczek S, Song J, Simon MC, Huang J, Simcox JA, Yoon D, Prchal JT, Gordeuk VR, Decreased serum glucose and glycosylated hemoglobin levels in patients with Chuvash polycythemia: a role for HIF in glucose metabolism, *J Mol Med*, 2013; **91**(1): 59-67.
- McNaughton L, Cedaro R, Sodium citrate ingestion and its effects on maximal anaerobic exercise of different durations, *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1992; **64**(1): 36-41.

- Miyake Y, Yamamoto K, Nagasaki M, Nakai N, Murakami T, Shimomura Y, Influence of lemon juice and citrate on blood lactate concentration after exercise in humans, *J Jpn Soc Nutr Food Sci*, 2001; **54**(1): 29-33.
- Ni Q, Wan FQ, Jing YH, Dong XY, Zhang YC, Effect of acute and chronic exposure to high altitude on the aerobic and anaerobic metabolism in rats, *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2015; **2015**: 159549.
- Nieman DC, Henson DA, Smith LL, Utter AC, Vinci DM, Davis JM, Kaminsky DE, Shute M, Cytokine changes after a marathon race, *J Appl Physiol*, 1985; **91**(1): 109-114.
- Ou LC, Hepatic and renal gluconeogenesis in rats acclimatized to high altitude, *J Appl Physiol*, 1974; **36**(3): 303-307.
- Paddison JS, Effing TW, Quinn S, Frith PA, Fatigue in COPD: association with functional status and hospitalisations, *Eur Respir J*, 2013; **41**(3): 565-570.
- Peake JM, Suzuki K, Coombes JS, The influence of antioxidant supplementation on markers of inflammation and the relationship to oxidative stress after exercise, *J Nutr Biochem*, 2007; **18**(6): 357-371.
- Pedersen BK, Febbraio MA, Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6, *Physiol Rev*, 2008; **88**(4): 1379-1406.
- Pritshard PJ and Lee DJW, The effect of dietary citrate on glycolysis in the intestinal mucosa and liver of the chicken, *Int J Biochem*, 1972; **3**: 322-328.

- Purshottam T, Kaveeshwar U, Brahmachari HD, Changes in tissue glycogen stores of rats under acute and chronic hypoxia and their relationship to hypoxia tolerance, *Aviat Space Environ Med*, 1977; **48**(4): 351-355.
- Saitoh S, Yoshitake Y, Suzuki M, Enhanced glycogen repletion in liver and skeletal muscle with citrate orally fed after exhaustive treadmill running and swimming, *J Nutr Sci Vitaminol*, 1983; **29**(1): 45-52.
- Sano T, Kawamura T, Goto E, Kito R, Nakamura J, Sakakibara F, Nishida T, Tsuchida I, Okuyama M, Sakamoto N, Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney –the effect of starvation and partial hepatectomy–, *J Jpn Diabetes Soc*, 1986; **29**(10): 881-887.
- Semenza GL, Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy, *Trends Pharmacol Sci*, 2012; **33**(4): 207-214.
- Starkie RL, Rolland J, Angus DJ, Anderson MJ, Febbraio MA, Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF-alpha levels after prolonged running, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001; **280**(4): 769-774.
- Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, Gassmann M, Candinas D, HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia, *FASEB J*, 2001; **15**(13): 2445-2453.
- Sugino T, Aoyagi S, Shirai T, Kajimoto Y, Kajimoto O, Effects of citric acid and L-carnitine on physical fatigue, *J Clin Biochem Nutr*, 2007; **41**(3): 224-230.

- Suhara T, Hishiki T, Kasahara M, Hayakawa N, Oyaizu T, Nakanishi T, Kubo A, Morisaki H, Kaelin WG Jr, Suematsu M, Minamishima YA, Inhibition of the oxygen sensor PHD2 in the liver improves survival in lactic acidosis by activating the Cori cycle, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015; **112**(37): 11642-11647.
- Terova G, Rimoldi S, Brambilla F, Gornati R, Bernardini G, Saroglia M, In vivo regulation of GLUT2 mRNA in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in response to acute and chronic hypoxia, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2009; **152**(4): 306-316.
- The top 10 causes of death, World Health Organization, 2014
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- Woolcott OO, Ader M, Bergman RN, Glucose homeostasis during short-term and prolonged exposure to high altitudes, *Endocr Rev*, 2015; **36**(2): 149-173.
- Wu J, Chen Y, Luo Y, Evaluation of the visual analog score (VAS) to assess acute mountain sickness (AMS) in a hypobaric chamber, *PLoS One*, 2014; **9**(11): e113376.
- Yamano E, Sugimoto M, Hirayama A, Kume S, Yamato M, Jin G, Tajima S, Goda N, Iwai K, Fukuda S, Yamaguti K, Karatsune H, Soga T, Watanabe Y, Kataoka Y, Index markers of chronic fatigue syndrome with dysfunction of TCA and urea cycles, *Sci Rep*, 2016; **6**: 34990.
- Yang J, Kalhan SC, Hanson RW, What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase?, *J Biol Chem*, 2009; **284**(40): 27025-27029.

Yasukawa S, Ebisuno S, Morimoto S, Uehara M, Ohkawa T, An enzymatic determination of serum citrate with citrate lyase, Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi, 1991; **82**(11): 1748-1753.

Yasukawa S, Takamatsu M, Ebisuno S, Morimoto S, Yoshida T, Ohkawa T, Studies on citrate metabolism in urolithiasis, 1. An enzymatic determination of urinary citrate with citrate lyase, The Japanese Journal of Urology, 1985; **76**(12): 1848-1854.

平成 26 年（2014）人口動態統計の概況，厚生労働省，2014

<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei14/index.html>

謝辞

本論文の作成にあたり、多大なご指導ご鞭撻を賜りました、昭和女子大学 生活機構研究科 生活機構学専攻 教授 江崎治先生に感謝の意を表します。また、副査として多くのご助言を賜りました、国立研究開発法人 理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター 生命機能的イメージング部門 イメージング基盤・応用グループ 細胞機能評価研究チーム チームリーダー 片岡洋祐先生、昭和女子大学 生活機構研究科 生活機構学専攻 教授 福島正子先生、同専攻 教授 海老沢秀道先生に、心より感謝申し上げます。また、大学院生活において多くのご支援を賜りました、同大学 生活機構学専攻および生活科学研究専攻の先生方に厚く御礼申し上げます。

大学3年次より約7年間、研究活動全般にわたり多大なご支援、ご指導を賜りました同大学 生活科学研究専攻 准教授 渡辺睦行先生に心より感謝申し上げます。充実した研究環境を整えて下さり、日々の研究だけでなく、学会活動など多くの研究者との交流の機会等を与えて下さったことは、私の研究生活の励みになりました。

LC-MS/MS 分析におきましては、国立研究開発法人 理化学研究所 生命機能的イメージング部門 イメージング基盤・応用グループ 細胞機能評価研究チームの皆様にも多大なご協力を賜りました。とりわけ、試験方法からデータ解析など多岐にわたりご指導を賜りました、同チーム研究員 久米慧嗣先生に心より御礼申し上げます。また、遺伝子発現解析やタンパク質の検出などの様々な実験手法において、ご助言やお力添え賜りました、一般財団法人 日本食品分析センター 安全試験部 安全試験課 主任 堀籠悟先生に心より感謝申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、多くの励ましとご助言を賜りました 諸学会の先生方に心より感謝申し上げます。

低酸素曝露試験にご協力頂きました 河井美都氏をはじめ、渡辺研究室の皆様には、学生生活や研究生活において大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。

最後に、いつも温かく見守り、支えてくれた家族、本研究に携わった皆様に深い感謝の意を表し、謝辞と致します。

2017年2月 原 百合恵